



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2016**

Departamento de Química

**Ana Tasso de  
Figueiredo Mendes  
Rosa**

**A influência das características da água para a  
estabilidade química, física, microbiológica e  
sensorial de produtos alimentares**





**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2016**

Departamento de Química

**Ana Tasso de Figueiredo  
Mendes Rosa**

**A influência das características da água para a  
estabilidade química, física, microbiológica e sensorial  
dos produtos alimentares**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes, Pós-doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coorientação do Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico à minha Mãe.



## **O Júri**

presidente

**Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**  
Professora Auxiliar, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

**Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço**  
Professora Auxiliar, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

**Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva**  
Professor Associado com Agregação, Departamento de Química da Universidade de Aveiro





## **Agradecimentos**

A toda a equipa Mendes Gonçalves, em especial à fantástica equipa de IDI, pela oportunidade da realização do estágio curricular em ambiente empresarial.

Às minhas orientadoras na empresa, Marta Nunes e Olga Matias pela orientação, ajuda, paciência, compreensão e confiança que em mim depositaram.

Aos meus orientadores na UA Doutora Cláudia Nunes e ao Prof. Manuel António Coimbra pela orientação e apoio.

Aos meus irmãos, pai e Hugo pelo carinho, incentivo, confiança e apoio incondicional ao longo da minha vida.

A todos os meus colegas e amigos.

A todos, muito obrigada pela dedicação, paciência, companheirismo e suporte para a realização deste trabalho.

"It is probably fair to suggest that food chemistry is the chemistry of water, since we need constant supply of water as long as we live."



**Palavras-chave**

Água, propriedades físico-químicas, análise sensorial, estabilidade microbiológica, vinagre, maionese, quitosana.

**Resumo**

A empresa Mendes Gonçalves, SA dedica-se à produção de vinagres, molhos e temperos. O aparecimento de turvação/sedimentos e perda de cor nos vinagres pela presença de anidrido sulfuroso é uma problemática das indústrias vinagreiras, sendo importante para a empresa a sua resolução. Por outro lado a água é o principal constituinte dos produtos da empresa consequentemente as suas características físico-químicas afetam muitas das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais destes produtos. Os objetivos deste trabalho foram 1) avaliar a influência das características da água na produção de vinagres e maionese e 2) estudar a conservação do vinagre de sidra utilizando filmes à base de quitosana. Este trabalho permitiu determinar o tratamento mais adequado a ser aplicado na água obtida na nova captação da empresa (furo novo) e a viabilidade da redução ou eliminação da utilização de dióxido de enxofre, utilizado como conservante no vinagre, garantindo a sua estabilidade microbiana e evitando a sua oxidação.

Na produção dos vinagres (vinho branco, 6% em ácido acético, e sidra, 5%) e da maionese foi utilizada água do furo novo e água destilada. Os vinagres foram também elaborados com e sem metabissulfito de potássio para avaliar a viabilidade da redução ou eliminação deste conservante quando se utiliza água destilada. Foram realizadas análises ao pH, turvação, cor, acidez e sensoriais durante 3 meses. As amostras de vinagre produzidas com água destilada sem adição de metabissulfito apresentaram melhores características sensoriais e maior estabilidade físico-química, não havendo formação de depósito e estabilização da cor. As amostras de vinagre tratadas com os filmes de quitosana levaram à clarificação do vinagre, apresentando uma menor turvação relativamente à amostra com metabissulfito. Estes vinagres apresentaram também uma cor mais estável, tendo-se observado um escurecimento no vinagre sem tratamento e uma cor demasiado clara no vinagre com metabissulfito.

Relativamente à maionese, a nível sensorial e estabilidade de cor, a amostra produzida com água destilada apresentou um melhor sabor e uma maior estabilidade físico-química e microbiológica, comparativamente às elaboradas com a água do furo novo.

Os resultados demonstram que a utilização de uma água com baixo teor de sais será uma mais-valia para a produção de vinagres e maionese. A formação de depósitos/nébulas nos vinagres poderá ser retardada ou prevenida, reduzindo a utilização de conservantes. Este efeito também pode ser potenciado com filmes à base de quitosana.



**Keywords**

Water, physical and chemical properties, sensorial, microbiological, stability vinegar, mayonnaise, chitosan.

**Abstract**

Mendes Gonçalves, SA is dedicated to the production of vinegars, sauces and seasonings. The turbidity / sediment formation and loss of colour in vinegars by the addition of sulphur anhydride is a problem of the vinegar industry. Consequently, it is very important for the company to solve it. On the other hand, water is the main constituent of Mendes Gonçalves products. Consequently, the amount and composition of water affect a large number of physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics of these products. The objectives of this work are 1) to understand the influence of water composition in the production of vinegars and mayonnaise and 2) to study cider vinegar preservation using chitosan-based films. This work will allow determining the most appropriate treatment to be applied to the water obtained from the new water hole of the company and the viability to eliminate or reduce the use of sulphur anhydride, used as preservative, to assure microbiological stability and to avoid oxidation.

In vinegars (white wine, 6% acetic acid, and cider, 5%) and mayonnaise production it was used water from the new hole and distilled water. In addition, the same vinegars were prepared with and without potassium metabisulphite to evaluate the viability of reduce or eliminate this preservative when used distilled water. Physicochemical and sensorial analyzes were performed along 3 months. Vinegar samples prepared with distilled water without metabisulphite showed better organoleptic characteristics and improved physico-chemical stability, namely no deposit formation and better colour attributes. The vinegar samples with chitosan films had a lower turbidity compared with the sample with metabisulphite due to the formation of a precipitate. This shows that chitosan films have potential to promote vinegar clarification. These vinegars also showed colour stability along storage, contrarily to the sample without treatment that became darker and the one with metabisulphite that became lighter.

In the mayonnaise, the sample with distilled water showed better flavour and higher physico-chemical and microbiological stability when compared to the one prepared with water from the new hole.

This work allows inferring that the use of water with lower content of salts may be an advantage for vinegar and mayonnaise production. The formation of deposits in vinegars can be delayed or even prevented by the use of water with this characteristic. This effect could be also enhanced by chitosan films.



## Lista de Abreviaturas

I – Força Iónica  
 $C_i$  – Concentração de electrólitos  
 $Z_i^2$  – Quadrado das cargas  
 $a_w$  - Atividade de água  
 $p$  – Vapor de pressão de água no alimento  
 $p_o$  – Vapor de pressão de água pura  
 $T$  – Temperatura  
 $P$  – Pressão total  
ETAs – Estações de tratamento de águas  
INSAAR - Inventário Nacional de Sistemas de Abastecimento de Água e de Águas  
OI – Osmose Inversa  
2-PG - 2-fosfoglicerato  
PEP - Fosfoenolpiruvato  
GA – Grau de acetilação  
 $M_m$  – Massa molecular  
PAC – Cloreto de polialumínio  
TDS – Teor de sólidos dissolvidos  
BCA – Método do ácido bicinconínico  
BSA – Albumina de soro bovino  
FN – Furo Novo  
FV – Furo Velho  
UFC – Unidades Formadoras de Colónias  
BAL – Bactéria Ácido Láctica  
Q – Quitosana  
VS-FN – Vinagre de Sidra com água FN e s/ sulfuroso  
VS-D – Vinagre de Sidra com água Destilada e s/ sulfuroso  
VS-FN-SO<sub>2</sub> – Vinagre de Sidra com água FN e c/ sulfuroso  
VS-D-SO<sub>2</sub> – Vinagre de Sidra com água Destilada e c/ sulfuroso  
VV-FN – Vinagre de Vinho com água FN e s/ sulfuroso  
VV-D – Vinagre de Vinho com água Destilada e s/ sulfuroso  
VV-FN-SO<sub>2</sub> – Vinagre de Vinho com água FN e c/ sulfuroso  
VV-D-SO<sub>2</sub> – Vinagre de Vinho com água Destilada e c/ sulfuroso





## Índice

1. Introdução .....	1
1.1 Água e as suas características físico-químicas.....	1
1.1.1. Atividade da água e a sua influência nos alimentos .....	3
1.1.2. Caracterização da água para consumo humano.....	5
1.1.3. Processo de tratamento de águas subterrâneas .....	6
1.1.4. Influência da qualidade da água na Indústria Alimentar .....	9
1.1.5. Interação da água com os constituintes dos alimentos .....	10
1.1.5.1. Influência da água nas proteínas.....	10
1.1.5.2. Influência da água nas enzimas .....	11
1.1.5.3. Influência da água nos hidratos de carbono.....	11
1.1.5.4. Interação dos minerais presentes na água com os alimentos.....	12
1.2. Quitina e Quitosana.....	15
1.2.1. Estrutura e Propriedades Químicas Quitina e Quitosana.....	15
1.2.2. Propriedades Biológicas .....	16
1.2.3. Aplicações .....	17
1.2.4. Derivados de Quitosana.....	18
2. Enquadramento do Trabalho .....	21
2.1. Vinagre – processo produtivo e sua conservação .....	21
2.2. Maionese – características e influência da água na sua estabilidade físico-química e sensorial .....	23
2.3. Objetivo do Trabalho.....	24
3. Materiais e Métodos .....	26
3.1. Amostras de água em estudo .....	26
3.2. Análise microbiológica e físico-química das águas .....	26
3.2.1. Condutividade e teor de sólidos dissolvidos (TDS) .....	27
3.2.2. Turvação .....	27
3.2.3. pH .....	27
3.2.4. Cloro Residual Livre .....	27
3.3. Produção dos vinagres .....	27
3.4. Produção de vinagre de sidra com filmes de quitosana.....	28
3.4.1. Preparação dos filmes de quitosana.....	28
3.4.2. Aplicação dos filmes de Quitosana .....	28
3.5. Caracterização físico-química dos vinagres em estudo.....	29
3.5.1. Medição de cor .....	29
3.5.2. Acidez.....	29
3.5.3. Teor de Enxofre Total.....	29
3.5.4. Turvação .....	30
3.6. Análise sensorial dos vinagres.....	30
3.7. Caracterização do sedimento das amostras de vinagre.....	31

3.7.1. Método Folin-Ciocalteu (Compostos Fenólicos) .....	31
3.7.2. Método do ácido bicinconínico (Teor Proteico).....	31
3.8. Produção de Maionese.....	32
3.8.1. Análise Microbiológica e físico-química .....	32
3.8.2. Acompanhamento Sensorial .....	33
3.9. Análise Estatística .....	33
4. Resultados e Discussão.....	34
4.1. Caracterização da água da nova captação.....	34
4.2. Influência da água nas caraterísticas físico-químicas e sensoriais .....	35
4.2.1. Análises físico-químicas ao vinagre ao longo do armazenamento.....	36
4.2.2. Análise sensorial .....	39
4.2.3. Formação de depósito .....	41
4.3. Influência das características da água na fermentação .....	41
4.3.1. Análise Físico-Química .....	42
4.3.2. Acompanhamento Sensorial .....	44
4.4. Viabilidade de aplicação de Filmes de Quitosana em Vinagres.....	44
4.4.1. Análise físico-química.....	44
4.4.2. Análise Sensorial .....	47
4.5. Influência da água nas caraterísticas e estabilidade físico-química e sensorial da maionese.....	49
4.5.1. Caraterização físico-química.....	49
4.5.2. Análise microbiológica .....	50
4.5.3. Acompanhamento sensorial .....	51
4.6. Aplicação de Filmes de Quitosana no tratamento de água.....	52
5. Conclusões e novas perspectivas de trabalho.....	55
6. Referências Bibliográficas.....	57

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Categorias de microrganismos que se desenvolvem num alimento dependendo da atividade de água ( $a_w$ ) (7). .....	5
Tabela 2: Valores obtidos em análises da água do furo novo relativamente aos parâmetros nitratos, mineralização, dureza e pH, e respetivos valores permitidos no Dec. Lei 306/2007 de 27 de Agosto. ....	34
Tabela 3: Características físico-químicas das águas utilizadas no desdobraimento dos vinagres em estudo. ....	36
Tabela 4: Valores de alguns parâmetros físico-químicos da água do furo novo submetida a um tratamento de Osmoses Inversa.....	42
Tabela 5: Variação de pH ( $T=20^{\circ}\text{C}$ ) das amostras de Vinagre de Cereal 5%, elaborados com diferentes águas, ao início e ao fim de um mês (FV-SO <sub>2</sub> – Água Furo Velho, c/ sulfuroso; FV - Água Furo Velho, s/ sulfuroso; FN- SO <sub>2</sub> - Água Furo Novo, c/ sulfuroso; FN V2 - Água Furo Novo, s/ sulfuroso) .....	43
Tabela 6: Caraterísticas físico-químicas das águas utilizadas na produção das maionese em estudo.....	50
Tabela 7: Acompanhamento microbiológico (Microrganismos a $30^{\circ}\text{C}$ ) das maionese em estudo - V1: Destilada + EDTA, V2: FN + EDTA, V3: Destilada, V4: FN. ....	52
Tabela 8: Características Físico-químicas da água recolhida antes da aplicação do filme de quitosana.....	54
Tabela 9: Resultados de análise microbiológica de amostra controlo (sem quitosana) e amostra com quitosana com 2 e 7 dias. ....	55

## Lista de Figuras

Fig. 1 Velocidade de reação em alimentos em função da atividade de água (11).....	4
Fig. 2: Esquema tipo de tratamento de águas subterrâneas em Portugal (15).....	7
Fig. 3: Porosidade e seletividade de processos de tratamento de membrana (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose inversa) (19).....	8
Fig. 4 Reação da enzima lactase na transformação de lactose em glucose e galactose (35). ....	11
Fig. 5 Decomposição do amido em unidades de maltose por ação da enzima $\beta$ -amilase (73). ....	12

Fig. 6: Mecanismo de oxidação de ácido ascórbico por complexação com $\text{Fe}^{2+}$ na presença de oxigénio com formação do ácido dehidroascórbico espécies ativas de oxigénio (36).	13
Fig. 7: Reação de conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato pela enzima enolase (39).	14
Fig. 8: Estrutura química da (a) quitina e (b) quitosana (41).	15
Fig. 9: Estrutura química da genipipa (a) e do genipósido (b) (58).	19
Fig. 10: Proposta de estrutura de reticulação da quitosana por <i>crosslinking</i> com genipina (61).	20
Fig. 11: Variação do pH dos vinagres de A) sidra e B) vinho diluídos com água do furo novo e água destilada, com e sem sulfuroso, ao longo do armazenamento ( VS-FN – Sidra, FN, s/ sulfuroso; VS-D – Sidra, Destilada, s/ sulfuroso; VS-FN-SO <sub>2</sub> – Sidra, FN, c/ sulfuroso; VS-D-SO <sub>2</sub> – Sidra, Destilada, c/ sulfuroso; VV-FN – Vinho, FN, s/ sulfuroso; VV-D – Vinho, Destilada, s/ sulfuroso; VV-FN-SO <sub>2</sub> – Vinho, FN, c/ sulfuroso; VV-D-SO <sub>2</sub> – Vinho, Destilada, c/ sulfuroso).	37
Fig. 12: Variação de Turvação (NTU) dos Vinagres de Sidra (A) e Vinho (B) desdobrados com água do furo novo e água destilada, com e sem sulfuroso (VS-FN – Sidra, FN, s/ sulfuroso; VS-D – Sidra, Destilada, s/ sulfuroso; VS-FN-SO <sub>2</sub> – Sidra, FN, c/ sulfuroso; VS-D-SO <sub>2</sub> – Sidra, Destilada, c/ sulfuroso); (VV-FN – Vinho, FN, s/ sulfuroso; VV-D – Vinho, Destilada, s/ sulfuroso; VV-FN-SO <sub>2</sub> – Vinho, FN, c/ sulfuroso; VV-D-SO <sub>2</sub> – Vinho, Destilada, c/ sulfuroso)	38
Fig. 13: Amostras de Vinagre de Vinho sem sulfuroso (A); Vinagre de Vinho com sulfuroso (B); Vinagre de Sidra sem sulfuroso (C); Vinagre de Sidra com sulfuroso (D), desdobrados com diferentes águas ao fim de 3 meses.	40
Fig. 14: Variação Total da Cor ( $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$ ) das amostras de Vinagre de Cereal 5% elaborado com água do Furo Velho FV-SO <sub>2</sub> e FV (sem SO <sub>2</sub> ); e com água com características da água de Osmose FN - SO <sub>2</sub> e FN (sem SO <sub>2</sub> )	44
Fig. 15: Amostras de vinagre de cereal 5% elaborados com água do FV e com água FN+água destilada (FV-SO <sub>2</sub> (V1): água FV com sulfuroso; FV (V2): água FV sem sulfuroso; FN-SO <sub>2</sub> (V3): água FN com sulfuroso; FN (V4): água FN sem sulfuroso....	45
Fig. 16: Variação Total de Cor ( $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$ ) das amostras de Vinagre de Sidra 5%, com Sulfuroso (SO <sub>2</sub> ) ou Quitosana (Q) ao longo de 2 meses.	46

Fig. 17: Variação de Turvação (NTU) dos Vinagres de Sidra 5% com Sulfuroso (SO <sub>2</sub> ) e com Quitosana (Q), com diferentes tempos de recolha (3,6,8,12 dias) ao longo de dois meses de estudo.....	47
Fig. 18: Amostras de vinagre de sidra com aplicação do filme de quitosana ao fim de um mês, onde é observável a formação de depósito.....	48
Fig. 19: Amostras de Vinagre de Sidra 5% elaboradas com água do FN, com Sulfuroso (Metabissulfito-FN), controlo e com Quitosana com 12 dias de estudo.....	49
Fig. 20: Variação Total de Cor ( $\Delta E$ ) das amostras de Maionese - V1: Destilada + EDTA, V2: FN + EDTA, V3: Destilada, V4: FN; ( $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$ ). ....	51
Fig. 21: Maionese V1: Destilada + EDTA, V2: FN + EDTA, V3: Destilada, V4: FN; A) com 1 Mês B) com 3 meses C) com 4 meses e D) com 9 meses. ....	53
Fig. 22: Valores de Condutividade (A) e Turvação (B) das amostras de água controlo (sem quitosana) e de água com quitosana, ao fim de dois e 7 dias de contato.....	54



# **1. Introdução**

## **1.1. Água e as suas características físico-químicas**

A água apresenta um papel bastante importante nas reações bioquímicas que sustentam a vida. Esta pode ser ingerida sob diversas formas, no seu estado puro ou em alimentos, permitindo a digestão, dissolução, transporte e absorção de nutrientes. Ainda permite a hidrólise, oxidação e utilização de nutrientes necessários para a obtenção de energia para diferentes células (1).

A água é um dos principais constituintes dos alimentos podendo variar de valores residuais a 98% da constituição do alimento, sendo que até mesmo os alimentos considerados ‘secos’ contêm alguma água (4 – 12%) (1,2). Consequentemente a quantidade e composição de água num alimento afeta praticamente todas as características de um alimento, como estabilidade físico-química e microbiológica, sabor e textura, devido à interação com proteínas, polissacarídeos, lípidos e sais (1 – 4). A água nos produtos alimentares pode ser intrínseca ou ser adicionada durante a sua produção (2,3).

A água é considerada um solvente universal, devido à sua polaridade e capacidade de formar ligações de hidrogénio (1). Também a sua elevada constante dielétrica torna esta molécula num solvente ideal de substâncias iónicas, devido à redução da atração entre iões positivos e negativos em eletrólitos (1). Em solução ocorrem interações entre as moléculas de água e de soluto (3).

A água associada aos alimentos pode ser classificada em três categorias: livre, absorvida e ligada (2). A água livre presente no alimento é a água que apresenta as mesmas propriedades da água pura, que está disponível para o crescimento de microrganismos e para reações enzimáticas (5). A água absorvida consiste naquela que está depositada na superfície das macromoléculas, como proteínas, pectinas e celulosas. Esta resulta na formação de sistemas coloidais. Quanto à água ligada, consiste na percentagem que estabelece ligações com componentes do alimento, ficando indisponível (2).

Os alimentos são constituídos por moléculas contendo grupos OH, C=O, NH que formam ligações de hidrogénio e interações dipolo-dipolo com moléculas de água. Para além destas interações também ocorrem interações dipolo-ião, hidrofóbicas e hidrofílicas (1).

A estrutura organizacional e interações da molécula de água são alteradas quando um soluto é introduzido. Isto resulta na alteração das propriedades da molécula de água, como a densidade, compressibilidade, ponto de ebulição e mobilidade (2,6). Nem todas as moléculas de água sofrem de igual forma o efeito do soluto, sendo este mais sentido pelas moléculas que se encontram na periferia do produto (água ligada) (6). A adição de solutos polares apresenta um efeito menor na estrutura molecular da água. Nas interações entre moléculas polares ou iónicas e moléculas de água, através de ligações de hidrogénio, interação ião-dípolo e polar-polar, permitem a dissolução e dispersão destas em solução (efeito hidrofílico) (1). Muitos constituintes dos alimentos são moléculas não carregadas, totalmente polares ou contendo certas regiões com carácter polar (álcoois, açúcares, polióis, proteínas, polissacarídeos e surfactantes) (6). No caso de solutos apolares, as moléculas de água tendem a reorganizar-se, de forma a conseguir obter um maior número de ligações por pontes de hidrogénio (6), formando agregados de micelas e clatratos (formas estáveis de pequenas moléculas apolares cercadas por moléculas de água) (1). A adição de substâncias hidrofóbicas/apolares, à água (hidrocarbonetos, triglicerídeos e proteínas) é termodinamicamente desfavorável devido à redução de entropia. Essa redução na entropia decorre do aumento de ligações de ponte de hidrogénio entre as moléculas de água adjacentes aos grupos apolares, provocada pela repulsão entre as moléculas de água e os grupos polares (5). Estes dois efeitos juntos estabilizam estruturas tridimensionais de macromoléculas como enzimas, proteínas e lípidos. Ao nível das enzimas, estes efeitos, exercem uma grande importância ao nível da conformação enzimática, e por consequente a catálise de reações específicas (1).

A água tem diferentes origens e consequentes diferentes conteúdos em minerais e sais (completamente ionizados), sendo a concentração de iões dependente da solubilidade do sal e do tempo de contacto entre a água e a origem do sal (minério, rocha, etc). A concentração de sais e minerais afeta a solubilidade dos constituintes alimentares. Por exemplo, em concentrações elevadas de eletrólitos as proteínas são destabilizadas por competição pelas moléculas de água com os iões, resultando na diminuição da solubilidade destas biomoléculas (1).

A concentração de eletrólitos em solução é medida através da força iónica (I), que consiste na metade da soma dos produtos das concentrações ( $C_i$ ) e o quadrado das cargas dos iões ( $Z_i^2$ ):



$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$$

Existem iões com características de estabilização e outros de destabilização da estrutura dos biopolímeros, afetando assim a sua hidratação (3). Em elevadas concentrações de soluto iónico a solubilidade das moléculas do biopolímeros na fase aquosa diminui, este efeito é conhecido geralmente por *salting-out*. Nesta situação o soluto compete com os biopolímeros pelas moléculas de água ainda disponíveis para a hidratação (6). O efeito contrário, isto é, baixa concentração de eletrólitos e aumento da solubilidade da proteína é denominado *salting-in* (1).

### 1.1.1. Atividade da água e a sua influência nos alimentos

A deterioração de um alimento é, normalmente, resultante do crescimento de microrganismos (MOs), atividade enzimática e reações químicas, as quais na sua maioria dependem da presença de água (5).

A atividade da água, o conteúdo e o estado da água são importantes para: i) a estabilidade físico-química e microbiológica dos alimentos, ii) a cinética de reações de deterioração (reações enzimáticas e não-enzimáticas, reações de oxidação, hidrólise química e bioquímica), e iii) o crescimento microbiano (2). Consequentemente este parâmetro é um importante meio de prever e controlar a vida de útil de produtos alimentares. A vida útil é o tempo durante o qual um produto permanecerá seguro, mantendo as características sensoriais, propriedades químicas, físicas e microbiológicas desejadas de forma a cumprir com a rotulagem nutricional (7).

A atividade de água é expressa pela razão entre o vapor de pressão da água no alimento ( $p$ ) e o vapor de pressão da água pura ( $p_0$ ), considerando a mesma temperatura ( $T$ ) e a mesma pressão total ( $P$ ) (3):

$$a_w = [p / p_0]_{P, T}$$

A atividade é dependente do estado físico da água e das suas interações com os restantes constituintes dos alimentos, dependendo da concentração, natureza química do soluto e temperatura (2). Esta consiste na água disponível, isto é, a água que não esteja ligada à matriz do alimento e que esteja disponível para o desenvolvimento microbiano (leveduras, fungos e bactérias). Este valor pode variar de 0 a 1, sendo os alimentos mais suscetíveis a contaminação com valores de  $a_w = 0,85-0,99$  (7).

A cinética e tipo de reação estão dependentes da atividade da água do alimento, pois esta comporta-se como um solvente, um reagente, ou pode alterar a mobilidade dos

reagentes (Fig.1). Em alimentos com atividade de água inferiores ou iguais a 0,3, a oxidação lipídica é retardada devido à redução da atividade catalítica dos metais; e são promovidas as reações de acastanhamento não enzimáticas. Em alimentos com atividades de água elevadas ( $a_w = 0,55 - 0,80$ ) a taxa de oxidação aumenta devido ao aumento da quantidade de oxigénio dissolvido e da mobilização dos catalisadores (iões metálicos), também se verifica aumento das reações de acastanhamento não enzimáticas em relação ao caso anterior (5,8). Por fim em alimentos com  $a_w$  superiores a 0,80, a água adicionada retarda os processos de oxidação, visto haver a diluição dos catalisadores reduzindo a sua eficácia (8). Ainda é verificado um aumento da cinética das reações enzimáticas e não enzimáticas com o aumento da atividade (2). Em alimentos com atividade de água menor ou igual a 0,60, o crescimento de microrganismos é mínimo, verificando-se possível desenvolvimento de contaminação para  $a_w$  atividades superiores (1,5,8–10).

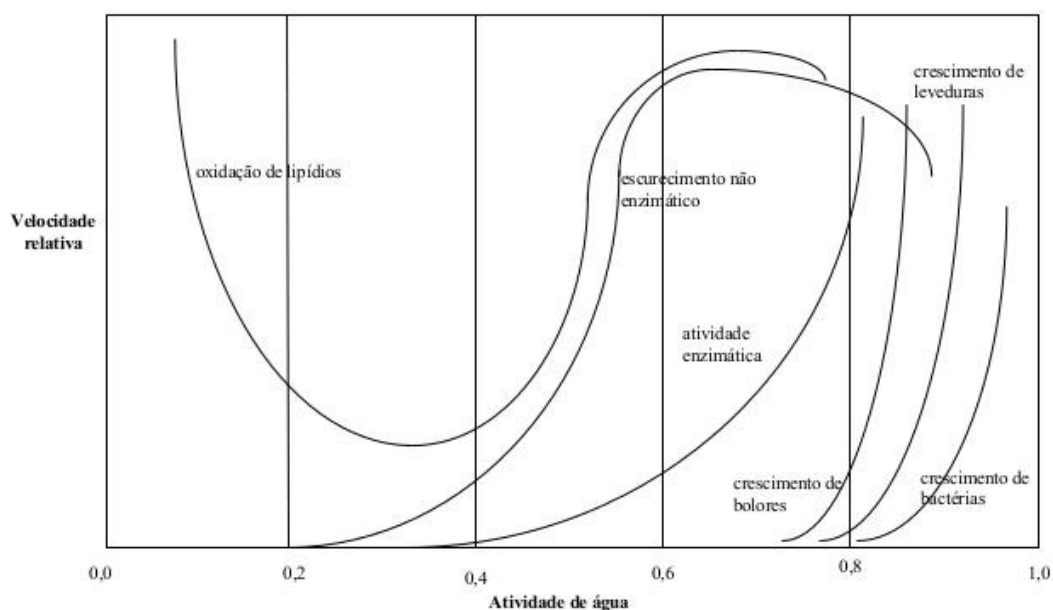


Fig.1: Velocidade de reação em alimentos em função da atividade de água (11).

O crescimento microbiano é controlado pela atividade de água do alimento, isto é, o crescimento de determinado grupo de microrganismos é dependente da atividade de água do produto (Tabela 1).

Tabela 1: Categorias de microrganismos que se desenvolvem num alimento dependendo da atividade de água ( $a_w$ ) (7).

Microrganismos	Atividade de Água ( $a_w$ )
Bactérias	0,91
Leveduras	0,88
Fungos	0,80
Bactérias Halófilas	0,75
Fungos Xerofílicos	0,65
Leveduras Osmofílicas	0,60

A atividade da água é um parâmetro a ter em consideração, visto afetar a textura, aparência, segurança e estabilidade de produtos (9). A perda de água e a taxa de deterioração dos alimentos é dependente da quantidade e atividade da água (2,9). As possíveis alterações na atividade de água de um alimento, por absorção de água quando um produto é exposto a um ambiente de alta humidade, ou perda de água quando colocado num ambiente de baixa humidade provocam alterações indesejáveis nos produtos, como perda de textura, podendo alterar o seu tempo de prateleira (11).

### 1.1.2. Caracterização da água para consumo humano

A água, tanto superficial como subterrânea, é veículo de muitos agentes causadores de doenças nos seres humanos. As doenças relacionadas com a contaminação da água de consumo humano constituem uma elevada responsabilidade e importância para a saúde pública (12). Um dos problemas causados pela ingestão de água contaminada resulta da falta de controlo e inspeção regular da qualidade da água de abastecimentos privados (13).

A água é um possível contaminante de alimentos: i) pela incorporação de água contaminada nos alimentos, ii) pela ingestão de alimentos cultivados com água contaminada e/ou iii) pela ingestão de alimentos que estiveram expostos a água contaminada durante o processamento. Como tal, também de forma a assegurar a qualidade do produto alimentar, a qualidade da água deverá corresponder aos requisitos de

uma água de qualidade para consumo humano. Por conseguinte existirão parâmetros da água que deverão ser adequados ao tipo de produto e que devem ser estritamente controlados (14).

Uma água de consumo humano deverá preencher os requisitos estabelecidos no Dec. Lei nº306/2007. O Dec. Lei define as obrigações das entidades gestoras, nomeadamente a apresentação de um programa de controlo da qualidade da água para consumo humano e a frequência de amostragem de acordo com a população. Ainda define os valores paramétricos de forma a assegurar uma água para consumo humano de qualidade de forma a reduzir ou eliminar situações de risco para a saúde humana. A caracterização da qualidade da água implica avaliação de diferentes parâmetros: físico-químicos, microbiológicos, organoléticos e presença de substâncias indesejáveis e tóxicas. A realização de análises a estes parâmetros deverá ser feita, preferencialmente em laboratórios de ensaios credenciados e por métodos analíticos de referência (13,15–17).

As entidades gestoras de distribuição ou de utilização de água para consumo humano têm de garantir que esta seja salubre, limpa e desejavelmente equilibrada. Consequentemente, não poderá conter nenhum microrganismo, parasita ou substância em quantidade ou concentração que possa constituir um perigo potencial para a saúde humana. Deverá cumprir as normas da qualidade fixadas no Dec. Lei acima referido e não poderá ter um carácter agressivo, nem incrustante ao longo do sistema de abastecimento. Cabe ainda às entidades gestoras assegurar obrigatoriamente um tratamento adequada da água, sendo que a água distribuída deverá pelo menos ser submetida a um processo de desinfecção (15,17).

### **1.1.3. Processo de tratamento de águas subterrâneas**

As Estações de Tratamento de Águas (ETAs) são infraestruturas que permitem o tratamento de uma água bruta (com possíveis diferentes origens) de forma a torná-la uma água própria para consumo humano. O processo de tratamento deverá ser adequado de acordo com a origem e qualidade da água (superficial ou subterrânea), podendo este ser de natureza química, física ou microbiológica.

Os processos de tratamento adequados para cada tipo de origem da água (superficial ou subterrânea) são identificados devido à caracterização da situação nacional das ETAs baseada no Inventário Nacional de Sistemas de Abastecimento de Água e de

Águas Residuais (INSAAR) e em informação cedida pelo Instituto Regulador de Águas e Resíduos e pela Águas de Portugal, S.G.P.S., S.A.

Na Fig.2 está representado um esquema genérico de tratamento de águas subterrâneas em Portugal (15). Uma estação de tratamento poderá não englobar todas as etapas de tratamento, dependendo das características da água bruta e o seu destino após tratamento.



Fig.2: Esquema tipo de tratamento de águas subterrâneas em Portugal (15).

Diversas técnicas são utilizadas no tratamento de águas para consumo humano. Para águas subterrâneas os processos de tratamento são menos intensivos devido à melhor qualidade deste tipo de águas, sendo habitualmente apenas necessária uma desinfecção. Contudo, por questões de segurança e dependendo do fim da utilização da água, pode ser efetuado um tratamento físico seguido de um tratamento de desinfecção (15).

O desenvolvimento de novos processos de tratamento será uma possível resposta à troca de processos químicos (desinfecção/oxidação), por processos biológicos e/ou físicos. A eficácia de remoção de metais pesados por microrganismos com capacidade de os oxidar tem sido verificada. Contudo ainda é necessário uma melhor perceção dos mecanismos deste processo de tratamento de água e da eficácia destes processos relativamente aos processos químicos e físicos (18).

Entre os processos físicos encontra-se a filtração por membranas. Os processos de tratamento por membrana mais utilizados são: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa (Fig.3) (15,19,20). Estes processos têm sido utilizados maioritariamente na indústria e em aplicações farmacêuticas, contudo atualmente existe uma procura deste processo no tratamento de águas para consumo humano (13,21). O tratamento por membranas é utilizado de forma a melhorar as características físico-químicas da água e também a sua qualidade microbiológica, assim como adequar a condutividade e controlar o teor de cloretos, sulfatos, cálcio, magnésio, nitratos e cobre (13,15).



Fig.3: Porosidade e seletividade dos processos de tratamento de membrana (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa) (19).

Na microfiltração ocorre a separação de partículas de um solvente por membranas de fluxo cruzado de baixa pressão, sendo possível filtrar substâncias coloidais e em suspensão (15,19,22). No caso da ultrafiltração a membrana utilizada para este método possui poros de ordem dos 0,01 a 0,001  $\mu\text{m}$ , sendo possível a remoção da maioria das bactérias, vírus e macromoléculas (15,19,22). Por outro lado, a nanofiltração, poderá ser utilizada na desmineralização, dessalinização e na remoção de cores. No caso de conter uma concentração de solutos orgânicos, sólidos em suspensão e iões polivalentes, o conteúdo permeado inclui iões monovalentes e soluções orgânicas de baixo peso molecular, tais como o álcool (15,19,20,22). A Osmose Inversa (OI) é um processo de filtração por membrana de alta pressão. Esta técnica é a mais frequentemente utilizada, podendo remover eficazmente a maioria de compostos inorgânicos, vírus e alguns contaminantes químicos (23–25). A osmose consiste na tendência natural da água de se direcionar através de uma membrana semipermeável de uma solução com baixa concentração em soluto para uma solução com maior concentração de soluto (21,25,26). Contudo, a OI requer que seja exercida uma pressão de forma à água se direcionar no sentido contrário à sua tendência natural através de uma membrana. Este processo requer bastante eletricidade de forma a criar a pressão necessária para levar à passagem da água, e gera uma grande quantidade de água residual (cerca de 10-20% da água bruta) (27).

A água resultante da OI é baixa em teor de minerais, de carbono orgânico total e necessita de uma quantidade residual de desinfetante, sendo o teor subprodutos de desinfecção minimizados (21). Consequentemente este tipo de tratamento pode ser uma maneira de eliminar ou de reduzir um tratamento químico que elevaria os níveis de subprodutos de desinfecção. A utilização de membranas não permite a exclusão total de

substâncias de baixo peso molecular, sendo necessário adequar a capacidade da membrana. A alta eficácia deste processo de OI na remoção de microrganismos e constituintes químicos faz com que este seja utilizado na maioria dos casos como única fase de tratamento ou combinada com uma quantidade residual de desinfetante (15,19,21).

As membranas apresentam uma grande eficácia na remoção de alguns compostos químicos como o arsênio, flúor, ferro, manganês e nitrato em cerca de 80%. As membranas utilizadas na OI podem corromper caso a quantidade de matéria orgânica na água seja elevada (15,27).

#### **1.1.4. Influência da qualidade da água na Indústria Alimentar**

A cor e a turvação são os principais parâmetros avaliados para determinação da qualidade da água na indústria alimentar. A alteração destes parâmetros provoca modificação das características dos produtos, como a cor e formação de precipitados (14), sendo também importante a utilização de uma água com características para consumo humano (21,26).

O odor de certas águas causado por diferentes compostos químicos, como sulfuretos e ferro, poderá ser transmitido aos produtos finais, gerando odores e sabores desagradáveis (14).

A alcalinidade elevada da água pode originar uma diminuição do aroma do produto alimentar e a precipitação de alguns compostos. No caso específico de produtos fermentados, a alcalinidade elevada não é propícia ao crescimento das leveduras (14). O pH da água influencia também a cor dos alimentos e o aroma, assim como a corrosão do equipamento de metal utilizado durante o processamento (14).

O teor de cloro dissolvido na água, derivado de processos de tratamento, poderá influenciar a alteração da cor, odor e sabor dos produtos e a deterioração de constituintes dos produtos (14,28). O cloro utilizado na desinfecção da água pode reagir com compostos presentes nos alimentos, como por exemplo os fenóis originando produtos *off-flavour*, os clorofenóis (halofenóis). Estes compostos podem ser identificados como um odor a cloro, sendo o limiar de percepção gustativa para os compostos mais odoríferos (como os diclorofenóis) de 1 µg/L (28,29).

Os nitratos que possam existir na água são causadores de odores desagradáveis e possível corrosão das paredes dos tanques de armazenamento da água ou dos produtos alimentares (14).

### 1.1.5. Interação da água com os constituintes dos alimentos

Nos alimentos, a água não é somente um meio de reação, mas é também um ingrediente ativo usado para controlar reações, comportamento físico-químico e biológico. A atividade de água é influenciada por sais, açúcares e outros compostos capazes de se ligarem fortemente à água (5). Consequentemente, as interações da água com os constituintes dos alimentos são influenciadoras das propriedades de sistemas alimentícios (11).

#### 1.1.5.1. Influência da água nas proteínas

A retenção de água é um parâmetro crítico na funcionalidade das proteínas, pois afeta a textura, cor e propriedades sensoriais dos produtos. Para além das propriedades funcionais também o tempo de prateleira e estabilidade são dependentes da constituição em água e na ligação proteína-água. Esta ligação das proteínas com moléculas de água depende dos grupos hidrofílicos constituintes das proteínas (imina, amina, carboxilo e hidrofílico) (1,30–32).

As propriedades funcionais das proteínas, incluindo a capacidade de formação de géis, viscosidade, estabilização de emulsões e espumas, estão dependentes das suas solubilidades em água (30,31,33). A solubilidade das proteínas em água está dependente do pH e da concentração em sais no produto (1,4,11). No ponto isoelétrico, as proteínas com grupo hidrofóbicos suficientes, agregam-se via ligações intermoleculares hidrofóbicas, devido à baixa repulsão electrostática, ocorrendo precipitação isoelétrica. Por outro lado, a proteína permanecerá em solução, caso as interações intermoleculares hidrofóbicas sejam escassas, devido à hidratação e repulsão esteárica (4,11,32).

A concentração de sais afeta a solubilidade das proteínas em dois sentidos. A baixa concentração, os sais aumentam a solubilidade destas macromoléculas (*salting-in effect*), pela supressão das interações electrostáticas proteína-proteína. Contrariamente a concentração elevada de sais, a solubilidade das proteínas é reduzida ocorrendo a precipitação das mesmas (*salting-out effect*) devido à hidratação iónica (4,30,32). Os aniões e catiões podem ser ordenados conforme o efeito de *salting-out*:  $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+ > NH_4^+ > SO_4^{2-} > Cl^- > NO_3^- > Br^- > J^- > CNS^-$  (4).



#### 1.1.5.2. Influência da água nas enzimas

A atividade da maioria das enzimas aumenta proporcionalmente à quantidade de água presente no meio, sendo esta última importante para a velocidade de reação e posição de equilíbrio (34).

A conjugação dos efeitos hidrofóbicos e hidrofílicos, juntamente com interações iônicas, levam a alteração da conformação das enzimas, sendo as suas funções modificadas. Por outro lado, a alteração do pH do meio (neste caso aquoso) afeta a carga das proteínas. Consequentemente, o pH também afetará a conformação/função das enzimas (1).

Na indústria de laticínios, a lactose é degradada enzimaticamente em glucose e galactose, pela enzima lactase. Esta enzima é produzida por bactérias ácido-lácticas e é ativada pela presença de uma molécula de água (Fig.4) (1,23).

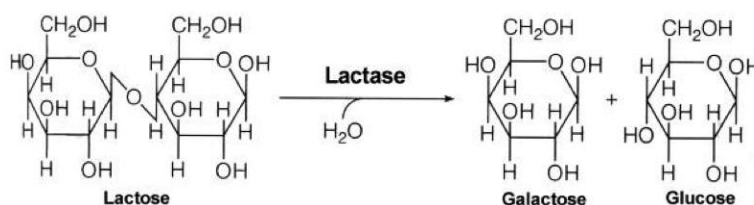


Fig.4: Reação da enzima lactase na transformação de lactose em glucose e galactose (35).

#### 1.1.5.3. Influência da água nos hidratos de carbono

A capacidade de ligação à água é uma das principais características dos hidratos de carbono devido aos vários grupos hidroxilo capazes de estabelecer ligações de hidrogénio com a água (5). Esta competição da água pelos grupos hidroxilos dos hidratos de carbono irá influenciar a sua conformação, e para além desta característica a água representa um papel importante na síntese destas macromoléculas fornecedoras de energia necessária aos organismos (1).

Nos alimentos os hidratos de carbono têm a capacidade de absorção da água existente, tendo um papel importante na manutenção da atividade de água (5). Quanto à solubilidade dos açúcares em água, esta está dependente da forma anomérica destes (alfa ou beta) e da quantidade de grupos hidroxilos disponíveis (5).

A maltose é composta por duas unidades de glucose, sendo derivada do reação da  $\beta$ -amilase no amido. No caso da indústria da cerveja o malte é resultado da produção da  $\beta$ -

amilase produzida durante a germinação do grão, sendo a enzima ativada quando os grãos são mergulhados em água (Fig.5) (35).

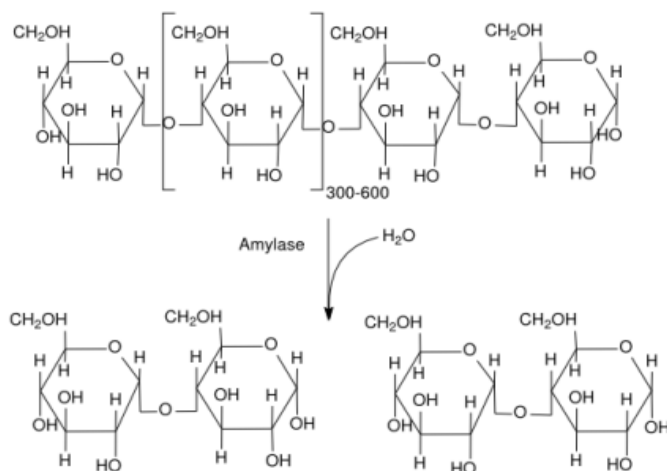


Fig.5: Decomposição do amido em unidades de maltose por ação da enzima  $\beta$ -amilase (73).

#### 1.1.5.4. Interação dos minerais presentes na água com os alimentos

Dependendo da origem a água poderá não se encontrar no estado puro, sendo uma solução aquosa onde estão presentes minerais sob a forma de sais ou eletrólitos, como por exemplo  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  (1). Muitos dos eletrólitos presentes na água, já são constituintes dos alimentos, tendo um papel bastante importante nas características sensoriais, na ativação/inibição de enzimas e outras reações químicas que possam afetar a textura do alimento (1,4).

Os íons metálicos podem influenciar a qualidade e aparência visual dos alimentos, causando a descoloração de produtos vegetais e frutas. Por exemplo, os polifenóis formam complexos com íons metálicos ( $Fe^{3+}$  e  $Al^{3+}$ ), originando uma cor azulada. Os íons metálicos também são responsáveis pela perda de alguns nutrientes, como por exemplo a oxidação do ácido ascórbico (Fig. 6) (4). Na presença de oxigénio ocorre a complexação do ácido ascórbico com o íon metálico de transição  $Fe^{2+}$ , havendo formação de uma espécie ativa de oxigénio ( $\cdot OH$ ). O mecanismo proposto (Fig.6) demonstra a oxidação do ácido ascórbico em ácido dehidroascórbico, por transferência eletrónica, e subsequente hidroxilação de um composto aromático (36).

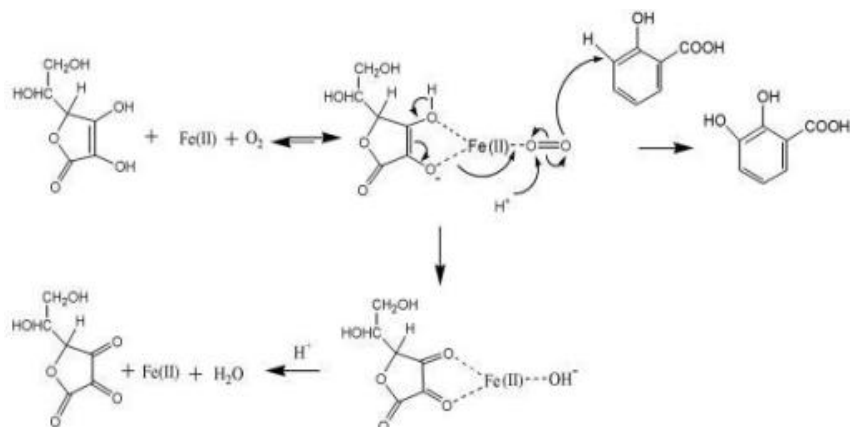


Fig.6: Mecanismo de oxidação de ácido ascórbico por complexação com  $\text{Fe}^{2+}$  na presença de oxigénio com formação do ácido dehidroascórbico espécies ativas de oxigénio (36).

Certos iões metálicos são responsáveis pelo desenvolvimento de odores desagradáveis, como o ranço, resultante da oxidação lipídica. No caso das emulsões, os lípidos utilizados contêm pequenas quantidades de peróxidos. A decomposição oxidativa destes peróxidos é acelerada por metais de transição existentes na fase aquosa da emulsão, como é o caso do ferro (37). Para além de catalisador da oxidação lipídica, o ferro, muitas vezes presente em quantidades significativas na água, aumenta a turvação nos vinhos (estado insolúvel), e ainda pode promover o crescimento de bactérias dependentes de ferro (4,38).

No caso do vinho, valores significativos de cobre podem levar à formação de precipitados ao fim de algum tempo de engarrafamento, devido à redução do cobre e precipitação deste na forma de complexos de sulfitos e complexos de proteína-cobre (38). O magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), muitas vezes presente na água, é um metal ativador de variadas enzimas, como por exemplo piruvato carboxilase, aminopeptidase e enolase (4). A enolase (fosfopiruvato hidratase) é responsável pela conversão de 2-fosfoglicerato (2-PG) em fosfoenolpiruvato (PEP), um dos passos da fermentação alcoólica (em que ocorre a transformação de glucose em etanol). Esta metaloenzima é ativada pela complexação com o substrato, 2-PG, e o ião metálico  $\text{Mg}^{2+}$  (Fig.7) (39,40).

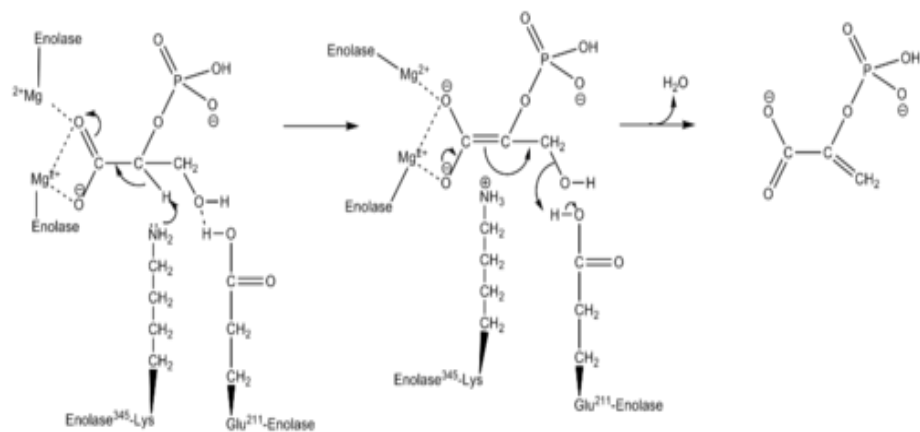


Fig.7: Reação de conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato pela enzima enolase (39).

## 1.2.Quitina e quitosana

Os biopolímeros naturais, nomeadamente polissacarídeos, têm vindo a despertar um grande interesse na ciência devido às suas propriedades físico-químicas, atividade biológica, biocompatibilidade, biodegradabilidade e disponibilidade de recursos naturais agrícolas e marítimos ricos nestes compostos (41–43).

A quitina é o segundo polissacarídeo natural com mais abundância a seguir à celulose. A indústria alimentar tem tido uma crescente procura na utilização deste tipo de polímero devido à grande diversidade de aplicações, às suas propriedades e características renováveis e biodegradáveis (41,43,44). Este polímero é sintetizado por diversos organismos e é facilmente obtido a partir da parede celular dos fungos e do exosqueleto dos artrópodes (crustáceos) (41–43).

### 1.2.1. Estrutura e Propriedades Químicas Quitina e Quitosana

A quitina, muito semelhante estruturalmente à celulose, é constituída por uma cadeia linear de unidades N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (N-acetilglucosamina) (Fig.8) (41–44).

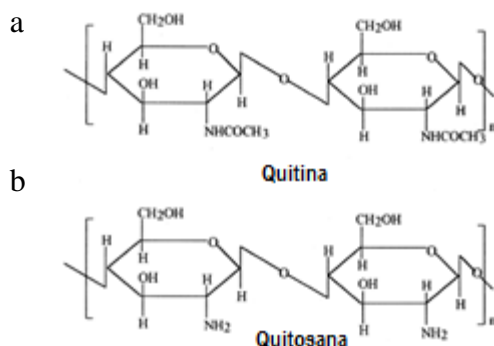


Fig.8: Estrutura química da (a) quitina e (b) quitosana (41).

A quitina é hidrofóbica sendo insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, devido à presença de ligações de hidrogénio inter e intramoleculares. Esta característica é a principal limitação da utilização deste biopolímero (42,43,45).

A quitosana é obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina e é composta por 2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcN) e de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcNAc) ligados por ligações covalentes  $\beta$ -1,4 (Fig.8) (41,42,44).

O grau de acetilação (GA) permite a diferenciação entre os dois compostos, sendo que o polissacarídeo é considerado quitosana quando tem um GA inferior a 50% (41-43,45,46). As propriedades e composição da quitosana variam dependentemente do GA e da sua massa molecular (Mm) (41,43,45 – 47). Um GA elevado resulta geralmente na presença de quantidades elevadas de grupos amina, que podem aumentar a capacidade de adsorção da quitosana por protonação (41,44,48). Por outro lado, a massa molecular afeta a solubilidade (um aumento da Mm leva a uma diminuição da solubilidade), propriedades bacteriológicas, efeito coagulante/floculante e cristalinidade. Esta última por sua vez afeta a capacidade de adsorção e acessibilidade aos grupos amina (41,43,48,49).

Este polímero apresenta menos limitações que a quitina, derivado da presença dos grupos amina ionizáveis que o torna solúvel em soluções ácidas diluídas, contrariamente à quitina que apresenta insolubilidade na maioria dos solventes (41,43,44,48). Contudo a solubilidade é um parâmetro de controlo crítico, pois está relacionado com diferentes parâmetros, como: concentração iónica, pH, natureza do ácido utilizado para a protonação, e distribuição de grupos acetilo ao longo da cadeia (41,42)

### **1.2.2. Propriedades Biológicas**

O interesse crescente por biopolímeros naturais reside na grande diversidade de propriedades biológicas, como biodegradabilidade (por enzimas proteolíticas) (41), anti-colesterolémica, analgésica, coagulante, antioxidante, biocompatibilidade, anti-inflamatória, antimicrobiana atraindo diferentes indústrias (41,44,50,51).

O mecanismo que confere as propriedades biológicas da quitosana pensa-se estar relacionado com o facto de ser um polieletrólito catiónico que ao ser dissolvido possui carga positiva no grupo amina. Esta propriedade permite ao polissacarídeo interagir com compostos polianiónicos, apresentando um efeito quelante para iões metálicos (42 – 45,49,52).

A atividade antimicrobiana do polímero está dependente do tipo de quitosana, grau de acetilação, massa molecular, microrganismos alvo, pH do meio, da presença de aditivos e/ou de outros componentes dos alimentos. São propostos três mecanismos principais responsáveis pela atividade antimicrobiana. O primeiro mecanismo consiste na interação dos grupos amina com carga positiva e com os grupos aniónicos na superfície das bactérias Gram-negativas que provoca a formação de uma camada impermeável em torno da célula impedindo a passagem de solutos essenciais para o interior da célula (42,44,47,53). O

outro mecanismo proposto resulta da propriedade de agente quelante de metais ou nutrientes essenciais, inibindo o crescimento microbiológico. Por último, envolve a inibição da síntese de RNA e proteínas pela penetração da quitosana no núcleo do microrganismos (42 – 44,47,53).

A atividade antimicrobiana da quitosana é dependente de certos fatores ambientais, como a temperatura e o pH. Este polímero torna-se policatiónico a um pH inferior ao pKa da molécula (6,3-6,5). Consequentemente o efeito inibitório da quitosana é mais forte a pHs mais baixos. Por outro lado quando o pH é superior ao pKa, os efeitos hidrofóbicos e quelantes são responsáveis pela atividade antimicrobiana em vez do efeito electroestático (42,43,47).

A capacidade antioxidante natural da quitosana tem grande interesse. Esta sua capacidade poderá ser devido à sua capacidade de quelação de iões metálicos, estabilizando os alimentos e aumentando assim a validade de um produto. Por exemplo, a quitosana forma complexos com metais ferrosos e assim retarda a oxidação lipídica. Por outro lado a quitosana tem capacidade de captar diferentes espécies de radicais. O mecanismo de ação proposto resulta do grupo amina e dos grupos hidroxilos ligados nas posições C2, C3 e C6 que reagem com os radicais. A capacidade antioxidante da quitosana está dependente do GA e da sua massa molecular (41,45,54 – 56).

### **1.2.3. Aplicações**

A propriedade de catião da quitosana confere-lhe a característica de único polímero catiónico pseudo-natural (42). A possibilidade da sua utilização como películas e filmes, aliada às suas propriedades biológicas e biocompatibilidade tem levado ao crescente interesse de aplicação em diversas áreas como a cosmética (42,45), farmacêutica (41,42,45), biomédica (41,42,45), alimentar (41,42,44,45), agricultura (41,42,45) e tratamento de águas e efluentes (41,42,45,49,54,55).

Na indústria alimentar, a principal aplicação dos revestimentos de quitosana é em forma de filmes edíveis. Estes podem ser definidos como uma camada fina de um material comestível aplicado nos alimentos por imersão, pulverização ou como embalagem. Para além destas características, a quitosana e seus derivados apresentam uma vasta gama de aplicações: preservação de alimentos da deterioração microbiana, recuperação de resíduos do processamento de alimentos, purificação de água e clarificação de sumos de fruta.

Ainda, a aplicação de filmes de quitosana na indústria alimentar tem demonstrado a eficácia deste biopolímeros na substituição de outros conservantes (42,43). A quitosana, em comparação com outros adsorventes e flocculantes convencionais, tem sido muito estudada no tratamento de águas, devido às suas propriedades específicas, como a carga positiva, elevada capacidade de adsorção de compostos, estrutura macromolecular, abundância e baixo custo. Os grupo  $-OH$  e  $-NH_3^+$  presentes estabelecem ligações com os íons metálicos, formando um complexo estável (48,49,52,55). A quitosana tem um poder de atração e de adsorção (dependente do pH) de substâncias aniônicas ao entrar em contato com a água, isto deve-se à protonação do seu grupo amina ( $-NH_2$ ) pelo  $H^+$  da água formando um polieletrólito catiónico (41,44,49).

A formação de flocos de grande dimensão na água que se depositam permite que a quitosana seja um bom eliminador de contaminantes orgânicos e de substâncias sólidas suspensas. As vantagens da sua utilização em relação a um flocculante tradicional são: menos quantidade necessária, menor quantidade de subprodutos produzidos, maior velocidade de deposição, alta eficiência e eficácia na remoção de contaminantes orgânicos, sólidos suspensos e íons metálicos (49,52,57). A quitosana ainda apresenta a vantagem de após vários ciclos de adsorção continuar a apresentar uma retenção eficaz após a regeneração (52,55,57).

A combinação de sais metálicos, como alumínio (coagulantes convencionais), e quitosana pode tratar eficazmente águas turvas de superfície (52). Estudos também foram feitos para verificar a eficácia de uma combinação de quitosana, cloreto de polialumínio (PAC) e silicato. Em comparação com o flocculante convencional, como PAC, a percentagem de remoção de contaminantes orgânicos, sólidos suspensos e  $Al^{3+}$  na água tratada, cresceu em 1,8-23,7%, 50% e 61,2-85,5%, respetivamente, usando esta quitosana combinada (49).

#### **1.2.4. Derivados de Quitosana**

Devido à sua versatilidade, é possível obter diferentes derivados de quitosana por modificações químicas. Esta modificação poderá ocorrer por ligação de enxertos (*grafting*) ou por reticulação polimérica (*crosslinking*) covalente ou iónica. Os grupos amina existentes na quitosana, são desencadeadores da maioria das modificações, por reações de N-acilação ou por formação de bases de Schif (42,43,58,59). Em particular, a reticulação pode ser usada com intuito de aumentar a resistência mecânica e estabilidade química,



controlar a permeabilidade e solubilidade aquosa do biopolímero (42,58,59). As principais alterações consistem na: menor solubilidade, menor hidrofiliidade, maior capacidade de absorção, menor porosidade e consequentemente menor permeabilidade ao vapor de água (43,59).

Existem diferentes derivados da quitosana reticulados de forma covalente, resultantes da reação com vários produtos químicos tais como glutaraldeído, dialdeídos, epóxidos, 3,4-ciclodextrina. Contudo, estes reagentes são relativamente citotóxicos, como o glutaraldeído que apresenta neurotoxicidade (42,43,58). Atualmente existem alternativas de reticulação com menor toxicidade como é o caso da genipina (42,43,58,59). Este composto revoga a capacidade para reticular certos resíduos com grupos amina primários (58).

A genipina é obtida a partir do genipósido (Fig.9), através de hidrólise enzimática com  $\beta$ -glucosidase. Este composto é extraído dos frutos da *Gardenia jasminoides Ellis* (originária da China) e de *Genipa americana* (originária da América do Sul e México).

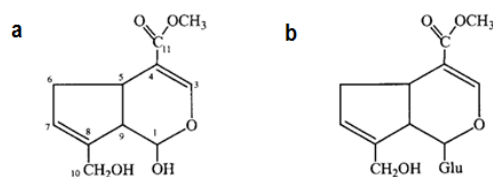


Fig.9: Estrutura química da genipina (a) e do genipósido (b) (58).

Um dos mecanismos propostos para a reticulação da quitosana pela genipina (Fig.10) consiste numa substituição nucleofílica em que o grupo éster na molécula de genipina é substituído por uma ligação amida secundária (reação 1). A ligação de outra molécula de quitosana ocorre por um ataque nucleofílico ao átomo de carbono 3 da genipina, por parte da amina primária da quitosana, originando a formação de um aldeído intermediário (reação 2). Após a abertura do anel, ocorre o ataque da amina secundária, resultante da reação 1, ao grupo aldeído. Desta reação resulta um composto heterocíclico com um átomo de azoto de resíduo da glucosamina da quitosana (43,60–62).

Outro mecanismo proposto inicia-se com o ataque nucleofílico da reação 2. Neste mecanismo o anel heterocíclico formado sofre desidratação e origina intermediários aromáticos. De seguida ocorre polimerização, dando origem a derivados heterocíclicos altamente conjugados de genipina com a quitosana. Ainda pode ocorrer a formação de uma

rede polimérica, por reação do grupo éster da genipina com o grupo amina da quitosana (59,60,62).

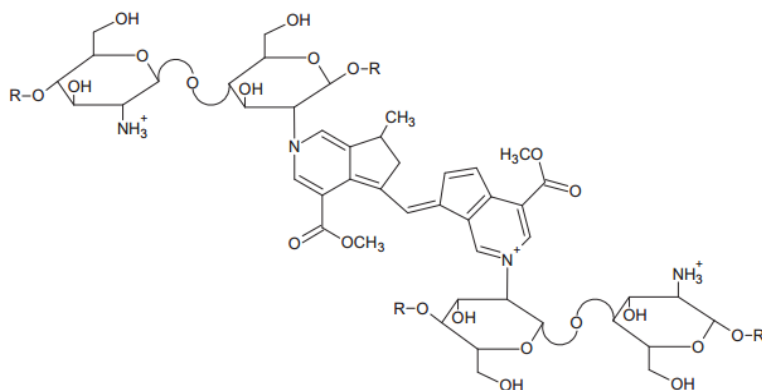


Fig.10: Proposta de estrutura de reticulação da quitosana por *crosslinking* com genipina (61).

Os filmes resultantes do *crosslinking* quitosana-genipina são mais estáveis em meios aquosos acídicos em comparação com filmes de quitosana. Estes filmes ainda possuem atividade antioxidante e antimicrobiana (43,61). Devido a estas propriedades o uso deste tipo de filmes foi proposto como conservante de vinho em alternativa ao anidrido sulfuroso (46).

## **2. Enquadramento do Trabalho**

A empresa Mendes Gonçalves SA, situada na Golegã, iniciou o seu percurso em 1982 com um produto original: vinagre de figo feito a partir do fruto cultivado pelos produtores locais. Atualmente, a empresa produz Vinagres, Molhos e Temperos, iniciando-se com a marca Peninsular e mais recentemente tem também como marcas próprias a Paladin e a Creative. A empresa engloba um Departamento de Investigação, Desenvolvimento e Inovação, Departamento de Qualidade e Departamento de Produção.

### **2.1. Vinagre – processo produtivo e sua conservação**

De acordo com o Dec. Lei nº 174/2007 entende-se por vinagre, o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética de produtos de origem agrícola (constituídos por açúcares fermentescíveis) (63).

Muitas das fermentações para obtenção de vinagres, têm origem em alimentos como frutos, grãos de cereais e raízes (p.e. batata doce, cenoura). Estes alimentos são constituídos por açúcares fermentescíveis, como a glucose e a frutose, que são submetidos a uma fermentação alcoólica. No caso de alimentos ricos em amido, a conversão deste em açúcares é possível graças a uma hidrólise enzimática, sendo formada glucose e maltose. A fermentação alcoólica ocorre graças à presença de leveduras (ex. *Saccharomyces*) e de um ambiente anaeróbico, permitindo assim a obtenção de álcool etílico (etanol) a partir dos açúcares. Em condições de aerobiose (oxigenação do depósito) e na presença de bactérias acéticas (ex. *Acetobacter*), o etanol é fermentado em ácido acético (64).

Após as fermentações, o vinagre obtido de acidez que pode chegar aos 12% de ácido acético (v/v), pode ser armazenado durante várias semanas. Quando é necessário embalar o vinagre, este é transferido para um depósito, denominado de desdobramento, onde é adicionado um volume de água que varia entre 50-60% de forma a originar um vinagre com uma acidez de 4-7% (v/v). Ainda neste depósito é feita a adição de anidrido sulfuroso, de forma a prevenir a oxidação no vinagre depois de engarrafado e de evitar o crescimento microbiológico no produto final. Antes de entrar na máquina de enchimento e ser embalado, o vinagre é filtrado de forma a eliminar possíveis colóides e compostos de turvação (64). Para termos legais o vinagre tem uma validade de 18 meses, contudo a sua validade poderá ser superior.

O dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), também designado anidrido sulfuroso ou somente sulfuroso, e as suas muitas formas de sulfitos inorgânicos como o metabissulfito de sódio ou potássio são bastante utilizados como conservantes em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos (65). Apesar de provocar o aparecimento de depósito nos vinagres, o dióxido de enxofre é utilizado como conservante por forma a garantir uma estabilidade microbiana e evitar a sua oxidação, apesar das suas características de pH baixo e acidez elevada (64). Segundo a legislação Portuguesa (Dec. Lei nº174/2007) é permitida uma quantidade até 170 mg/L de teor de enxofre total nos vinagres.

O anidrido sulfuroso quando adicionado ao vinagre é dissociado em diferentes formas moleculares (livre e combinada), sendo estabelecido um equilíbrio entre elas dependendo do pH do meio e da constante de acidez. O dióxido de enxofre combinado consiste naquele que se ligou a outros componentes do vinagre, como aldeídos, açúcares, taninos e ácidos cetónicos. Por outro lado, existe o dióxido de enxofre livre ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{HSO}_3^-$  e  $\text{SO}_3^{2-}$ ), isto é que não está associado a outro composto. Quando é feita a determinação da concentração do teor de sulfitos no vinagre é determinado o teor de enxofre total, isto é o somatório do teor de enxofre livre e combinado (43,66).

O consumo de alimentos conservados com sulfitos apresenta um problema para pessoas que não são portadoras da enzima (sulfito redutase) que os decompõe. Estas desenvolvem dores de cabeça, náuseas e problemas respiratórios. (43,66).

Tal como na indústria vinícola, a adição de  $\text{SO}_2$  nos vinagres também tem sido da preocupação dos produtores vinagreiros. Consequentemente, têm sido procuradas novas alternativas a este tipo de conservante, tal como o ácido ascórbico. Contudo, o ácido ascórbico apenas apresenta características antioxidantes, contrariamente ao sulfuroso que também apresenta características antimicrobianas. Por outro lado, os subprodutos resultantes da degradação do ácido ascórbico, como o ácido dehidroascórbico, são potentes pró-oxidantes que aceleram o processo de formação de nébulas do vinagre (64). Consequentemente, as alternativas propostas não se revelaram tão eficientes como o anidrido sulfuroso. A pesquisa referente a outros tipos de conservantes do vinagre é muito reduzida, sendo necessário mais estudos, de forma a encontrar a substituição mais adequada de forma a garantir que se mantenha as características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas do vinagre.

## **2.2. Maionese – características e influência da água na sua estabilidade físico-química e sensorial**

A empresa dedica-se também à produção de molhos e temperos. Muitos dos molhos produzidos são emulsões. A água representa um papel bastante importante nas propriedades físico-químicas e organoléticas das emulsões, sendo a sua estabilidade e formação influenciada pela densidade, viscosidade, índice refrativo, capacidade calorífica específica, condutividade e constante dielétrica da fase aquosa (6). Por exemplo, a capacidade de produção da emulsão está dependente da viscosidade e tensão interfacial da fase aquosa. Por outro lado, a estabilidade da emulsão depende da força das interações repulsivas e atrativas entre as gotículas que por sua vez estão dependentes da força iónica, constante dielétrica e índice refrativo da fase aquosa. O sabor da emulsão depende da taxa de volatilidade de moléculas de aroma no alimento, que são influenciados pela polaridade e viscosidade da fase aquosa (6).

A maionese (o/w) é caracterizada pela interação de uma grande quantidade de óleo numa fase aquosa, que contém um teor substancial de oxigénio dissolvido, contribuindo para a oxidação lipídica. Adicionalmente, durante o processo de produção poderá ocorrer a entrada de ar, sendo estes fatores determinantes na estabilidade do produto (67). A fase aquosa das emulsões contém uma variedade de constituintes hidrossolúveis: minerais, ácidos, bases, aromas, conservantes, vitaminas, açúcares, surfactantes, proteínas e polissacarídeos (67). O sabor característico da maionese é derivado essencialmente à adição de mostarda que contém isotiocinatos. Estes compostos são estabilizados em soluções aquosas pela adição de ácido cítrico (67). Os isotiocinatos são solúveis em solventes orgânicos mas só alguns são solúveis em água. Nas emulsões, as moléculas de aroma encontram-se repartidas na fase aquosa ou na gordura dependente da sua solubilidade. Contudo a maioria destas moléculas encontram-se na fase aquosa. (67).

Os diferentes sais presentes na água afetam a qualidade da emulsão em diferentes graus, provavelmente devido ao efeito dos diferentes iões sobre as interações da água na emulsão. A presença de iões polivalentes e de pequenos iões com forte campo elétrico como  $\text{Na}^+$ , promove a interação entre moléculas de água. Este processo permite o aumento da viscosidade da emulsão. Contrariamente, iões monovalentes de grandes dimensões ( $\text{K}^+$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) causam a rutura da interação entre as moléculas de água (67). Os minerais existentes na fase aquosa da emulsão poderão apresentar efeitos adversos na estabilidade

de agregação de emulsões de óleo em água, como a maionese, devido ao efeito das ligações iónicas e à blindagem electrostática (6). Os efeitos são sentidos mesmo para baixas concentrações de minerais ( $< 5 \text{ mM}$ ). Certos metais pesados, como o ferro e o cobre, quando presentes promovem a deterioração da emulsão, promovendo a oxidação lipídica. Nestas situações, onde está presente uma elevada quantidade de minerais, são utilizados agentes quelantes de forma a remover os minerais. Os minerais também podem influenciar as propriedades funcionais de outros constituintes alimentares, como o caso dos biopolímeros (6).

Os biopolímeros são adicionados às emulsões óleo em água com o intuito de aumentar a viscosidade da fase aquosa. A estabilidade de floculação em emulsões deste tipo é dependente das propriedades eléctricas das gotículas, do pH e força iónica da fase aquosa. A força iónica da solução aquosa está dependente da concentração e valência de iões. Com o aumento da força iónica, a repulsão electrostática entre gotículas é progressivamente perdida até não ser suficientemente forte para prevenir a floculação. O impacto negativo de iões multivalentes na estabilidade da emulsão poderá ser reduzido pela utilização de água pura (6,67).

As interações existentes nas emulsões entre grupos polares e moléculas de água são determinantes nas propriedades dos constituintes dos alimentos. Por exemplo, no caso dos surfactantes a hidratação dos grupos polares deste constituinte é responsável pela sua agregação e estabilidade (6).

### **2.3. Objetivo do Trabalho**

A empresa Mendes Gonçalves, SA dedica-se à produção de vinagres, molhos e temperos. O aparecimento de turvação/sedimentos e perda de cor nos vinagres pela adição de anidrido sulfuroso é uma problemática das indústrias vinagreira, sendo importante para a empresa a sua resolução. Por outro lado a água é o principal constituinte dos produtos da empresa consequentemente as suas características físico-químicas afetam muitas das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais destes produtos.

Os objetivos deste trabalho foram 1) avaliar a influência das características da água na produção de vinagres e maionese e 2) estudar a conservação do vinagre de sidra utilizando filmes à base de quitosana. Assim, foi feita primeiramente a caracterização físico-química e microbiológica da água do furo novo. Seguidamente foi utilizada água destilada na produção de vinagres e maionese para mimetizar o tratamento da água por osmose inversa,

permitindo assim determinar se este será o tratamento mais adequado a ser aplicado na água obtida da nova captação.

Posteriormente foi estudada a viabilidade da redução ou eliminação da utilização de anidrido sulfuroso nos vinagres utilizando os filmes à base de quitosana, garantindo a sua estabilidade microbiana e evitando a sua oxidação.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Amostras de água em estudo**

Neste trabalho foi utilizada água designada como Furo Novo, proveniente de uma nova captação de água na empresa, e água destilada, de origem comercial.

A água originária do Furo Novo foi recolhida de diferentes profundidades do furo para um depósito de 500 L onde foi desinfetada com hipoclorito de sódio de forma a garantir um cloro residual livre de 0,2 – 0,5 mg/L. Antes de ser utilizada na preparação das amostras foi filtrada com filtros de papel (aproximadamente 1 µm) para remoção de partículas em suspensão.

Para comparação das características físico-químicas do vinagre produzido, foi utilizada uma amostra de vinagre anteriormente produzida com água do Furo Velho. A água do Furo Velho, uma água já desinfetada com hipoclorito de sódio e filtrada.

#### **3.2. Análise microbiológica e físico-química das águas**

Para caracterização da qualidade da água e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram considerados os limites descritos na legislação em vigor, o Decreto de Lei nº306/2007 de 27 de Agosto de 2007. Na caracterização da qualidade da água da nova captação foi considerado o resultado médio obtido de análises de controlo em laboratório de análises de água externo e interno, regidas pelo Dec. Lei nº306/2007.

As amostras de água para análise microbiológica interna, foram recolhidas em frascos de 500 mL previamente esterilizados, sendo feita uma purga (eliminação de impurezas na zona de recolha) antes da recolha. Para avaliação dos parâmetros microbiológicos foram considerados os Métodos ISO aplicados no Laboratório de Microbiologia da empresa: Microrganismos a 30°C (Método ISO: 4833-2003), bactérias ácido-láticas (Método ISO:15214-1998), *Enterobacteriaceae* (Método ISO: 21528 – 1:2004), por teste de filtração por membrana e inoculação. Foram realizadas recolhas de amostras de água em diferentes profundidades do furo.

Os parâmetros físico-químicos avaliados internamente foram condutividade, teor de sólidos dissolvidos (TDS), turvação, pH, e cloro residual.

Os restantes parâmetros, regidos pelo Dec. Lei nº306/2007, e controlo de qualidade de água para consumo humano foram avaliados em Laboratório (externo) Acreditado de Análises de Qualidade de Água.



### **3.2.1. Condutividade e teor de sólidos dissolvidos (TDS)**

O método utilizado para determinação da condutividade e TDS das amostras de água utilizadas foi o medidor de condutividade Medidor multi-parâmetros (modelo HI – 2030-02, HANNA) e Sonda de Condutividade com sensor de platina (modelo HI 76310, HANNA). O valor representa quantas miligramas de sais se obteria na evaporação de um litro de água. A calibração foi feita com solução 0  $\mu\text{S}/\text{cm}$  e solução de cloreto de potássio de 1413  $\mu\text{S}/\text{cm}$  da mesma marca que o equipamento.

### **3.2.2. Turvação**

Para este parâmetro foi utilizado um Turbidímetro (modelo TB 210 IR, LOVIBON). A calibração foi feita com soluções standard de formazina do kit de <0,1, 20, 200 e 800 NTU.

### **3.2.3. pH**

O pH foi determinado utilizando o medidor de pH de bancada para pH/T°C (modelo HI 2210-02, HANNA), com eléctrodo de pH modelo HI 1131B. As calibrações foram feitas com soluções standard de pH 4,01 e 7,01.

### **3.2.4. Cloro Residual Livre**

O cloro residual livre foi determinado utilizando um fotómetro (Checker®HC HI 701, HANNA). A determinação do cloro residual é feita pela reação entre o cloro e o reagente N,N-dietil-*p*-fenilenediamina (DPD) que provoca uma coloração rosa na amostra. O valor de cloro residual é determinado pela medição da intensidade da cor formada.

## **3.3. Produção dos vinagres**

Os vinagres em estudo, Sidra, Vinho Branco e Cereal, foram produzidos segundo o método de produção da empresa Mendes Gonçalves, SA. O método consiste na fermentação alcoólica no caso das matérias-primas Sidra e Cereal (mistura de cereais), seguida de uma fermentação acética submersa, em que as bactérias acéticas estão presentes numa mistura anterior de vinagre (mãe do vinagre) com o líquido a fermentar (fermentado alcoólico), em condições controladas de temperatura e de aerobiose. Este método destaca-se em relação aos restantes (Método Alemão ou rápido, Método de Orleães ou lento) devido á sua alta produtividade, condizente com a demanda industrial da atualidade. Após as fermentações foi obtido um vinagre de acidez que poderá chegar aos 12% de ácido

acético, designado por Vinagre Duplo, que foi armazenado em depósitos. No momento do desdobramento do vinagre, isto é a diluição do vinagre para obtenção de uma acidez aceitável para o consumidor (4-7% em ácido acético (v/v)), foi adicionado um tipo de água: i) água destilada, ii) água furo novo, iii) água furo novo diluída com água destilada, ao vinagre duplo e o conservante anidrido sulfuroso, cerca de 160 mg/L. À escala laboratorial não foi possível a utilização do anidrido sulfuroso, consequentemente em laboratório para realização dos estudos foi utilizado metabissulfito de potássio (320 mg/L).

### **3.4. Produção de vinagre de sidra com filmes de quitosana**

#### **3.4.1. Preparação dos filmes de quitosana**

Uma solução aquosa de quitosana 1,5% (m/v) em ácido acético 0,1 M foi preparada sob agitação constante durante cerca de 16 h à temperatura ambiente. Seguidamente foi adicionada à solução 0,75% de glicerol como plastificante sendo colocada em banho de água a 50 °C durante 10 min, sob agitação, de modo a homogeneizar a solução. Após o arrefecimento da mistura quitosana-glicerol, à temperatura ambiente, procedeu-se à filtração em filtro poroso G2. Posteriormente foram adicionados 250 µL de solução genipina 10% (m/v) em etanol, sob agitação constante, de forma a obter uma concentração final de 0,05 % (m/v). Deixou-se a solução sob reação durante uma hora, sendo posteriormente desgaseificada sob vácuo. Após desgaseificação transferiu-se 31 g da solução para placas de plexiglass 12x12 cm (área útil de 144 cm<sup>2</sup>) sendo estas colocadas em suporte previamente nivelado. Seguidamente este foi colocado no escuro, à temperatura ambiente, durante 24 h. Depois das 24 h as placas foram colocadas na estufa a 35°C durante cerca de 16 h, de forma a evaporar o solvente e formação do filme.

#### **3.4.2. Aplicação dos filmes de Quitosana**

A adição dos filmes de quitosana-genipina foi feita na altura da diluição do vinagre, tal e qual como é feito aquando da adição do anidrido sulfuroso.

Foram preparadas 3 amostras diferentes, de Vinagre de Sidra 5%, em depósitos de 10 L: Controlo (sem conservante), com Metabissulfito de potássio (320 mg/L) e com Filme de Quitosana (4 filmes de área útil de 144 cm<sup>2</sup>). Foram retiradas de cada depósito, amostras (4 x 250 mL) ao dia 1 e após 3, 6 e 12 dias de forma a fazer um acompanhamento mensal da estabilidade físico-química e sensorial das diferentes amostras.

A adição dos filmes foi feita sequencialmente, tendo sido adicionado um filme (144 cm<sup>2</sup>) no primeiro dia, no segundo dia adicionados mais dois filmes, sendo que o último filme foi adicionado ao terceiro dia.

### **3.5. Caracterização físico-química dos vinagres em estudo**

#### **3.5.1. Medição de cor**

Para a medição e quantificação da cor das amostras em estudo foi utilizado um método espectrofotométrico, o sistema CIELab. As leituras foram efetuadas num espectrofotômetro CM-5 (Konica Minolta), em modo transmitância, onde foram colocados cerca de 2 mL no recipiente apropriado para amostra. O sistema CIELab é descrito por três coordenadas cartesianas baseado na percepção da cor pelo olho humano. Estas três coordenadas correspondem à Luminosidade (coordenada L), Tonalidade e Cromaticidade (coordenadas a\* e b\*) e definem a cor da amostra. A Luminosidade corresponde à transmitância da amostra, sendo que os seus valores oscilam entre 0 (para uma amostra completamente opaca) e 100 (para uma amostra completamente transparente). Quanto à tonalidade e cromaticidade, a\* e b\*, correspondem a eixos de cores antagónicas, sendo que o eixo a\* varia de vermelho (+a\*) ao verde (-a\*) e o eixo b\* varia de amarelo (+b\*) ao azul (-b\*). Para uma avaliação da variação total da cor das amostras será considerada a seguinte fórmula  $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$  (68).

#### **3.5.2. Acidez**

A acidez das amostras de vinagre foi quantificada em teor de ácido acético. Esta determinação foi feita por uma titulação das amostras de vinagre (cerca de 6 mL de amostra) com uma solução de hidróxido de sódio 1 mol/L, sendo utilizada uma gota de solução de fenolftaleína como indicador. A titulação é terminada aquando a mudança de cor da amostra analisada (tons rosados). O volume gasto de solução hidróxido de sódio na titulação é diretamente proporcional à quantidade de ácido acético existente na amostra (v/v).

#### **3.5.3. Teor de Enxofre Total**

Para a determinação do teor de enxofre total dos vinagres foi utilizado o Método de Rebelei, em que foram utilizadas as soluções fornecidas pela empresa Schliessmann Schwäbisch Hall. Neste método o ácido sulfuroso é destilado numa solução alcalina

oxidante de iodato de potássio, sendo titulada após a acidificação do agente oxidante utilizado com tiosulfato de sódio. A 10 mL de amostra de vinagre foram adicionados, num balão volumétrico 100 mL, 2 mL de solução de sulfato e 10 mL de metanol. Após ebulição durante 6 minutos, foram adicionados 10 mL de solução de amido e 10 mL de solução de sulfato ao destilado. A titulação foi feita com solução de tiosulfato de sódio, sendo o ponto de viragem visível por mudança de cor da amostra para tons azulados. A quantidade de titulante utilizado é proporcional ao teor de enxofre total na amostra (mg/L). Neste método não foi possível designar as soluções e concentrações certas utilizadas devido a não fornecimento desta informação por parte do fornecedor do kit de determinação de teor de enxofre total.

#### **3.5.4. Turvação**

Para este parâmetro foi utilizado o Turbidímetro da marca LOVIBON, modelo TB 210 IR. A calibração foi feita com soluções standard de formazina do kit de <0,1, 20, 200 e 800 NTU.

### **3.6. Análise sensorial dos vinagres**

Às amostras de vinagre foram realizadas análises sensoriais, de forma a acompanhar a sua evolução/ estabilidade sensorial. Os testes sensoriais foram efetuados na sala de provas da Mendes Gonçalves, S.A., específica para ensaios de produtos alimentares (ISO 8589 Sensory analysis – General guidance for the design of tests rooms), sendo reduzidos os diversos fatores que as condições físicas têm no julgamento humano. Nas provas, foram selecionados diferentes provadores da empresa Mendes Gonçalves, SA, familiarizados com o produto analisado, mas não especializados em análise sensorial. O grupo era composto por 17 elementos, 8 do sexo masculino e 9 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 24 e os 53 anos.

A cada provador foi dada uma breve explicação do tipo de teste a realizar e uma ficha de prova utilizada pela empresa (anexo I). Os provadores deveriam identificar, caso existisse, a diferença entre as amostras de vinagre e descrever quais as diferenças identificadas. Foi utilizado um teste triangular em duas amostras de vinagre de sidra com um mês de produção: desdobrado com água do furo novo (VS-FN-SO2) e desdobrado com água destilada (VS-D-SO2). Em ambas as amostras foi adicionado metabissulfito de potássio. As amostras foram numeradas com os números 372, 594 e 681.

### 3.7. Caracterização do sedimento das amostras de vinagre

Para a caracterização dos sedimentos que surgem nos vinagres, foram escolhidas duas amostras, uma de Vinagre de Sidra e outra de Vinagre de Cereal, ambos elaborados com a água do Furo Velho. Estas amostras (uma amostra de 250 mL de cada tipo de vinagre) foram centrifugadas numa centrífuga *Sigma Laboratory Centrifuger* a 15000 rpm durante 15 min a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi retirado após centrifugação, sendo os sedimentos lavados com água destilada e novamente centrifugados. Após centrifugação os sedimentos de cada amostra foram colocados na estufa a 37 °C durante cerca de 2 horas, para remoção do solvente.

#### 3.7.1. Método *Folin-Ciocalteu* (Compostos Fenólicos)

De forma determinar a composição do sedimento presente nos vinagres foi realizado um teste de determinação de teor de compostos fenólicos, Método de *Folin-Ciocalteu*, descrito por *Singleton and Rossi (1985)*. Este método baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu (complexo polimérico formado pelos ácidos fosfomolibdicos ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) e fosfotúngsticos ( $H_3PW_{12}O_{40}$ )) aquando da oxidação dos fenóis, dando origem a produtos de reação de coloração azul (óxidos de tungsténio ( $W_8O_{23}$ ) e de molibdénio ( $Mo_8O_{23}$ )), proporcionais à quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras (69).

A todas as amostras foi feita uma extração ácida em metanol, ficando cerca de 3 mg de sedimento em contacto com 5 mL de solução de metanol e ácido fórmico (99:1 (v/v)) durante a noite, sob agitação. A solução metanólica foi centrifugada (3000 rpm durante 5 min) de forma a remover a parte insolúvel. A 0,125 mL da amostra (extrato fenólico) e 0,5 mL de água destilada foram adicionados 0,125 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu*, ficando a reagir durante 5 minutos. De seguida, foram adicionados 1,25 mL de  $Na_2CO_3$  (75 g/L) e 1 mL de água destilada e deixou-se reagir durante 90 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 760 nm. Os compostos fenólicos totais foram quantificados utilizando uma curva de calibração obtida com ácido gálico (entre 0 e 500 mg/L).

#### 3.7.2. Método do ácido bicinconínico (Teor Proteico)

O teor proteico dos sedimentos das amostras de vinagre foi determinado recorrendo ao método do ácido bicinconínico (*Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich*). O princípio deste ensaio é semelhante ao Método de *Lowry*, isto é, ambos estão

relacionados à formação de um complexo de  $\text{Cu}^{+2}$  – Proteína em meio alcalino, seguido da redução do  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^{+}$ . A quantidade proteína é proporcional à redução do cobre. A redução do cobre é seguida pela formação de um complexo lilás-azul, com origem na complexação do BCA com o  $\text{Cu}^{+}$  (70).

Para este ensaio foi utilizada uma placa de 96 poços em cada poço foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  da amostra de sedimento do vinagre e 200  $\mu\text{L}$  de *BCA Working Reagent* (1:8). Este último, foi preparado previamente pela junção do Reagente A (*BCA Solution*) com o Reagente B (*Copper (II) Sulfate Pentahydrate 4% Solution*) na proporção 50:1. A absorvância foi medida a 560 nm. O teor proteico foi quantificado utilizando uma curva de calibração obtida com a solução Standard de Proteína (*BSA – Bovine Serum Albumin*) (entre 0 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ).

### **3.8. Produção de Maionese**

Neste estudo foi selecionada uma maionese com reduzida percentagem de gordura (24% de óleo) e grande quantidade de água (57%). Foram elaboradas amostras com água destilada e amostras com água proveniente do Furo Novo. No mesmo ensaio ainda foram feitas amostras com e sem EDTA, de forma a analisar a capacidade antioxidante deste composto. Foram feitas análises sensoriais, físico-químicas e microbiológicas mensalmente das amostras. Ainda foram colocadas duas amostras de cada maionese na estufa a 40°C com 75% de humidade, durante 3 meses, de forma a acelerar o processo de armazenamento, correspondendo a 9 meses à temperatura ambiente.

As maioneses foram produzidas em reatores de homogeneização à escala laboratorial, seguindo uma receita base de maionese (fase aquosa, fase oleosa, emulsionante, conservantes, espessantes e antioxidantes).

#### **3.8.1. Análise Microbiológica e físico-química**

Para avaliação dos parâmetros microbiológicos foram considerados os Métodos ISO aplicados no laboratório de Microbiologia da empresa: Microrganismos a 30 °C (Método ISO: 4833-2003), bactérias ácido-láticas (Método ISO:15214-1998), *Enterobacteriaceae* (Método ISO:21528-1:2004) e bolores e leveduras (ISO: 21527:1-2008).

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH e cor, tal como descrito anteriormente para a água (3.2.3) e para os vinagres (3.5.1).

### **3.8.2. Acompanhamento Sensorial**

As amostras de maionese foram regularmente provadas por diferentes colaboradores da empresa familiarizados com o produto, de forma a acompanhar a sua evolução e estabilidade. Cada provador deveria identificar, caso existisse, a diferença entre as amostras de maionese e descrever quais as diferenças identificadas. As características analisadas foram: cor, sabor, odor e identificação do sabor a ranço.

### **3.9. Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente de forma a verificar qual ou quais são significativamente diferentes. Tal avaliação foi realizada com recurso aos testes F e *t-student* com um nível de significância de 95% e ainda o teste ANOVA (ferramentas do Microsoft Excel 2007). As diferenças foram aceites como significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização da água da nova captação

A água da nova captação (furo novo) foi caracterizada segundo os requisitos para água de consumo humano descritos no Dec. Lei nº306/2007 de 27 de agosto num laboratório certificado de análises de água (Tabela 2). A água da nova captação não preenche os requisitos de uma água para consumo humano, devido ao teor de nitratos (58,9 – 82,1 mg/L) acima do valor máximo permitido (50 mg/L). No entanto, esta água pode ser utilizada para diluição dos vinagres que, sendo no máximo de 50%, permite assim obter a concentração de nitratos em valores legais. Relativamente à mineralização da água, esta apresenta valores de 600-700  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , sendo acima dos valores de condutividade de uma água de qualidade boa para consumo humano que deverá ser entre 400-600  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , sendo que uma água excelente tem uma condutividade inferior a 400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Quanto à dureza, a água da nova captação apresenta uma dureza mediana (189 mg/L  $\text{CaCO}_3$ ), devendo o valor ser inferior a 150 mg/L para ser considerada uma água de boa qualidade. Por último, em algumas amostras o pH da água do furo novo encontrava-se inferior a 6,5 que é o valor mínimo de uma água para consumo humano.

Tabela 2: Valores obtidos em análises da água do furo novo relativamente aos parâmetros nitratos, mineralização, dureza e pH, e respetivos valores permitidos no Dec. Lei 306/2007 de 27 de Agosto.

	Nitratos (mg/L)	Mineralização ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Dureza (mg/L $\text{CaCO}_3$ )	pH
Furo Novo	58,9 – 82,1	600 - 700	189	< 6,5
Valor permitido Dec. Lei 306/2007	< 50	< 600	< 150	> 6,5

A nível microbiológico foram feitas contagens de microrganismos (MOs) a 30 °C, bactérias ácido-láticas e *Enterobacteriaceae*, por teste de filtração por membrana e inoculação. Estes testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia, tendo sido realizadas recolhas de amostras de água em diferentes profundidades do furo. Devido a um grande número de colónias não foi possível contar as colónias no teste de filtração por



membrana, por isso foram só tidos em conta os resultados do teste por inoculação. A primeira recolha foi feita mais à superfície do furo, sendo a contagem de MOs de  $3,0 \times 10^2$  UFC/mL, e a contagem de bactérias ácido-láticas e *Enterobacteriaceae* inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL. A segunda amostra de água foi feita a uma maior profundidade, de forma a chegar mais ou menos a meio do furo, sendo a contagem nos três parâmetros inferior a  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL.

A água da nova captação não apresenta qualidade de uma água para consumo humano na totalidade os parâmetros, segundo as características descritas no Dec. Lei 306/2007.

Os parâmetros não aceitáveis como os nitratos, dureza da água, condutividade e pH deverão ser ajustados com um tratamento de água adequado, como por exemplo, osmose inversa, nanofiltração ou destilação, de forma a obter uma água com características apropriadas para consumo humano.

#### **4.2. Influência da água nas características físico-químicas e sensoriais**

O objetivo deste ensaio foi determinar a influência das características da água nas características físico-químicas e sensoriais nos vinagres de sidra e de vinho. Para tal foram utilizadas água com diferentes características: água furo novo, água destilada e água furo novo com 2 diferentes diluições com água destilada. A água destilada apresenta características semelhantes a uma água obtida após o tratamento de osmose inversa. Foram elaboradas as diluições da água do furo novo, de forma a obter águas de diferentes durezas, pH, mineralização e diminuição dos constituintes da água como o ferro, impurezas, nitratos e TDS. Neste ensaio foram elaborados vinagre de vinho branco (6%) e vinagre de sidra (5%) diluídos com os quatro tipos de águas (Tabela 3). Estas águas apresentavam valores de pH entre 7,9 e 5,2, condutividades de 455 e 0  $\mu$ S/cm e turvação entre 1.47 e 0.13 NTU, sendo os valores superiores correspondentes à água do furo e os inferiores à água destilada. Os mesmos vinagres foram produzidos com e sem metabissulfito de potássio. A todas as amostras de vinagre produzidas foram realizadas análises físico-químicas e sensoriais, durante 3 meses.

Tabela 3: Características físico-químicas das águas utilizadas no desdobramento dos vinagres em estudo.

Tipo de água	pH (20°C)	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Turvação (NTU)
Furo Novo	7,87	455	1,47
Furo Novo diluído com 50 % água destilada	7,70	236	0,46
Furo Novo diluído com 80% água destilada	7,57	113	0,41
Destilada	5,82	0	0,13

Durante o armazenamento (feito à temperatura ambiente) não foram identificadas diferenças significativas para os parâmetros analisados nas amostras elaboradas com diferentes diluições da água do furo novo, diluições 50 e 80 %. Consequentemente, de forma a simplificar a apresentação dos resultados, serão apresentados somente os referentes aos vinagres elaborados com água do furo novo sem diluição e aos vinagres com água destilada.

#### ***4.2.1. Análises físico-químicas ao vinagre ao longo do armazenamento***

Nos dois tipos de vinagre, vinho e sidra, os vinagres diluídos com água destilada apresentavam um pH inferior, devido ao pH da água ser inferior ao da água do furo, sendo esta diferença mais evidente no vinagre se sidra (Fig.11). No que diz respeito aos vinagres com e sem sulfuroso, estes últimos apresentavam um pH ligeiramente superior (Fig.11).

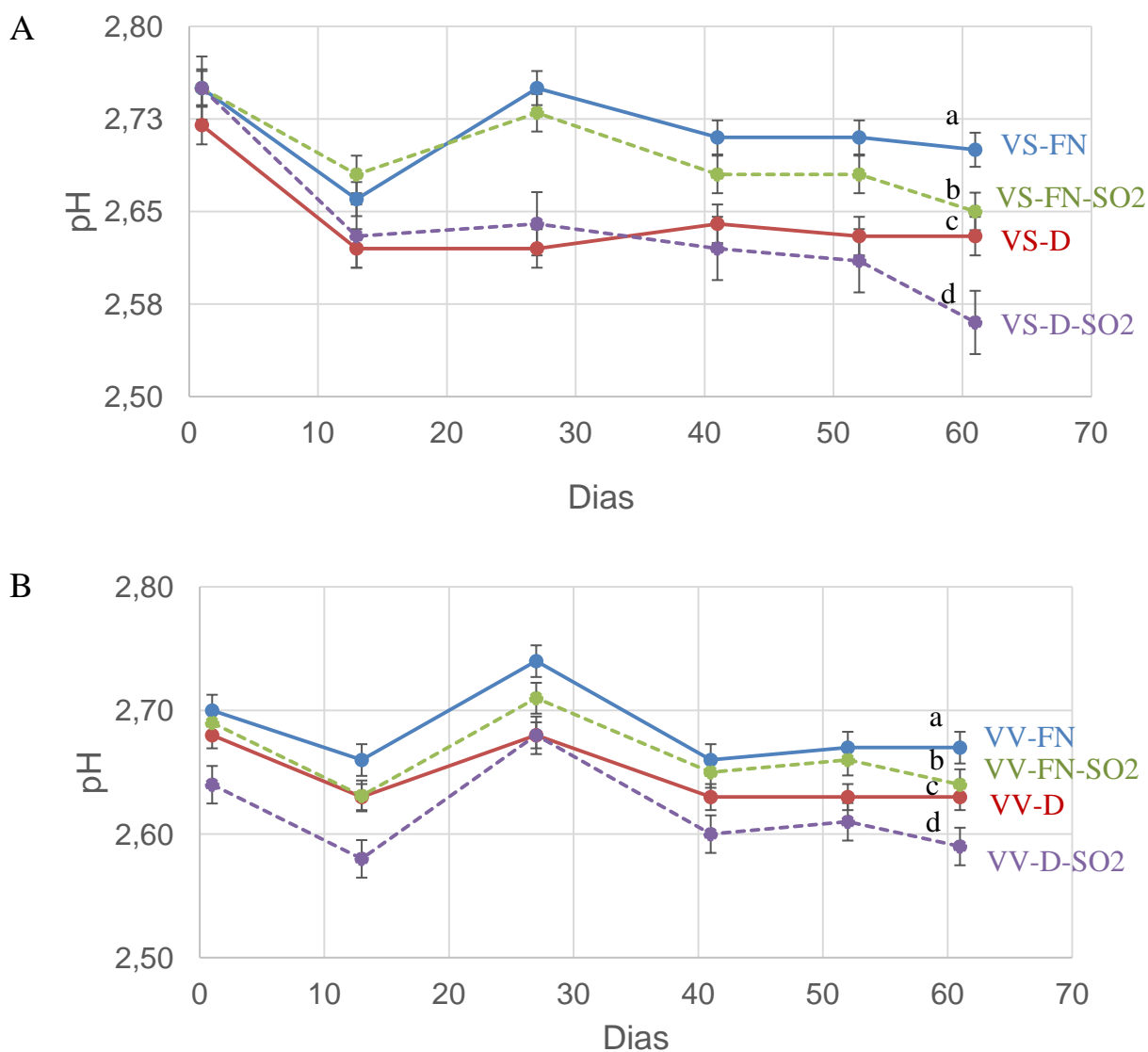


Fig.11: Variação do pH dos vinagres de (A) sidra e (B) vinho diluídos com água do furo novo e água destilada, com e sem sulfuroso, ao longo do armazenamento ((VS-FN – Sidra, FN, s/ sulfuroso; VS-D – Sidra, Destilada, s/ sulfuroso; VS-FN-SO2 – Sidra, FN, c/ sulfuroso; VS-D-SO2– Sidra, Destilada, c/ sulfuroso; VV-FN – Vinho, FN, s/ sulfuroso; VV-D – Vinho, Destilada, s/ sulfuroso; VV-FN-SO2 – Vinho, FN, c/ sulfuroso; VV-D-SO2– Vinho, Destilada, c/ sulfuroso) (diferentes letras indicam valores estatísticos diferentes  $p \leq 0,05$ ).

Relativamente ao parâmetro da turvação (Fig.12), os dois tipos de vinagre apresentaram comportamentos diferentes. Contudo em ambos os casos houve um ligeiro

aumento de turvação ao longo dos três meses, exceto no caso do vinagre desdobrado com água destilada e com sulfuroso (VS-D-SO<sub>2</sub>/VV-D-SO<sub>2</sub>) que teve uma ligeira diminuição nos últimos meses. No caso dos vinagres de sidra foram os sem sulfuroso que apresentaram uma menor turvação, contrariamente ao vinagre de vinho que foram os com sulfuroso que apresentaram menor turvação. Esta diferença verificou-se na mesma altura que foi observada a formação de depósito nos vinagres de sidra com sulfuroso, enquanto nas amostras de vinagre de vinho não se identificou formação de precipitado. A promoção na formação de precipitado no caso do vinagre de sidra pode ser resultante da presença de iões em maior quantidade, quando comparado com o vinagre de vinho. Isto é, o fermentado de sidra utilizado, poderá conter maior número de iões, resultante do tipo de matéria-prima, acelerando o processo de *salting-out* de proteínas existentes.

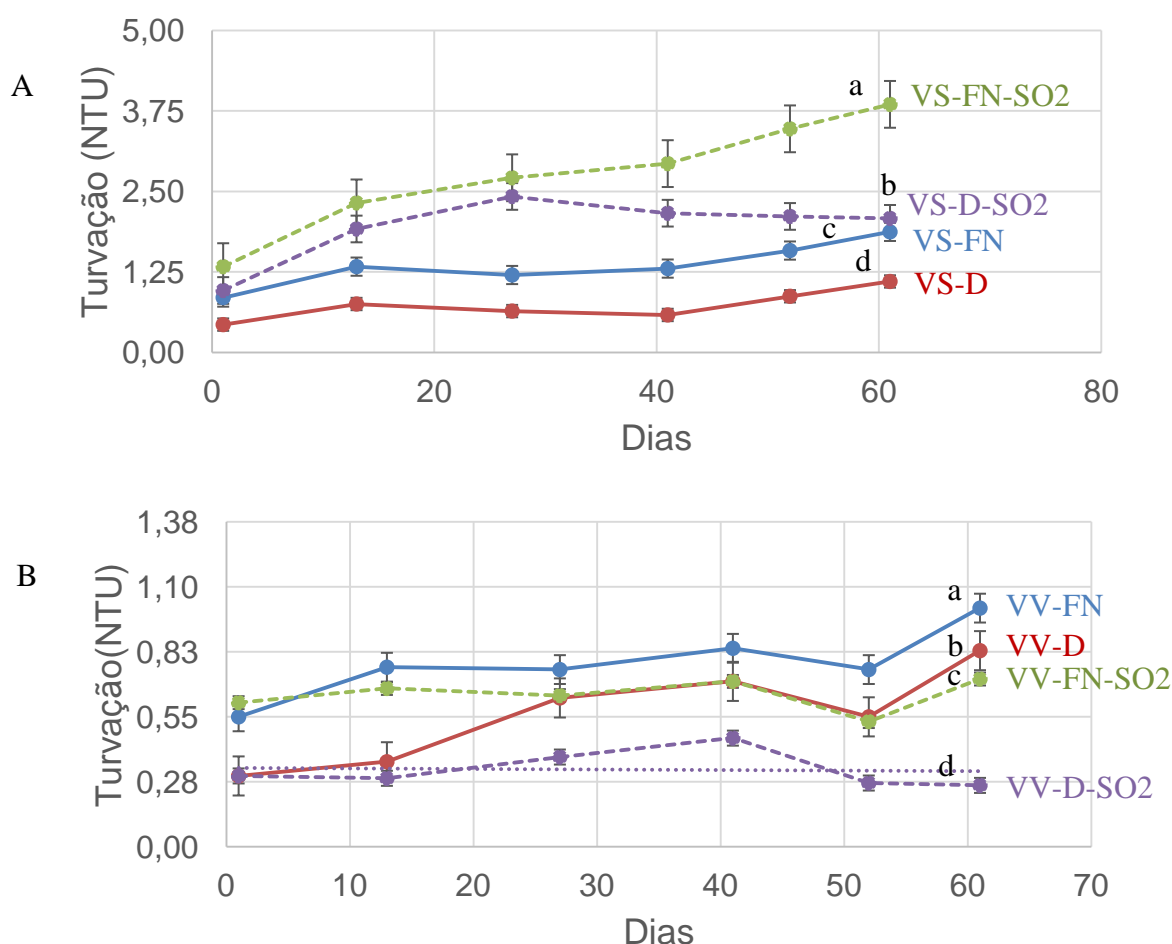


Fig.12: Variação de Turvação (NTU) dos Vinagres de Sidra (A) e Vinho (B) desdobrados com água do furo novo e água destilada, com e sem sulfuroso (VS-FN – Sidra, FN, s/ sulfuroso; VS-D – Sidra, Destilada, s/ sulfuroso; VS-FN-SO<sub>2</sub> – Sidra, FN, c/ sulfuroso; VS-D-SO<sub>2</sub> – Sidra, Destilada, c/ sulfuroso); (VV-FN – Vinho, FN, s/ sulfuroso; VV-D– Vinho, Destilada, s/ sulfuroso; VV-FN-SO<sub>2</sub> – Vinho, FN, c/ sulfuroso; VV-D-SO<sub>2</sub> – Vinho, Destilada, c/ sulfuroso). (diferentes letras indicam valores estatísticos diferentes  $p \leq 0,05$ ).

O decréscimo acentuado do teor de enxofre total foi observado nas amostras com sulfuroso, sendo idêntico nas amostras preparadas com água do furo novo e com a água destilada. Este decréscimo de teor de enxofre total nas amostras poderá resultar de um decréscimo do teor de enxofre livre. No caso do vinho, após a abertura da garrafa podem ser verificados três casos para o decréscimo do teor de enxofre livre: formação de aldeído, organismos de deterioração, e a introdução de novos compostos no vinho (69,71). A exposição ao oxigénio leva à oxidação do álcool do vinho, sendo formados aldeídos. Estes por sua vez combinam-se com enxofre livre (71). Por outro lado, o decréscimo poderá resultar de contaminação por microrganismos que estabelecem ligações com o SO<sub>2</sub>. Por último, a inserção de novos compostos no vinho, como carvalho, taninos, açúcares e clarificantes, leva à formação de novas ligações destes com o SO<sub>2</sub> (71). No vinagre podem também ocorrer este tipo de mecanismos que provoquem a diminuição do sulfuroso ao longo do armazenamento.

#### ***4.2.2. Análise Sensorial***

Uma análise sensorial foi realizada pelos provadores da empresa Mendes Gonçalves de forma a perceber a aceitabilidade dos dois vinagres de sidra desdobrados com água do furo novo e com água destilada, ao fim de um mês. Apenas 23% dos provadores identificou corretamente a amostra diferente. De acordo com a norma ISO 4120:2004 (anexo II), o mínimo de respostas corretas necessárias para concluir que existem diferenças perceptíveis entre as amostras, tendo em conta o número de provadores e o nível de significância de 5%, seriam necessárias 10 respostas corretas. Tendo sido obtidas apenas 4 respostas corretas, podemos então concluir que as amostras não apresentam diferenças perceptíveis pelos provadores.

Para além da prova sensorial realizada no primeiro mês foi feito um acompanhamento sensorial das amostras. Neste caso não foi realizado qualquer tipo de teste, sendo apenas dado a provar as amostras em estudo. As amostras de vinagre de sidra e de vinho elaboradas com água destilada foram descritas com um sabor mais suave, mais aromático e menos acentuado, sendo classificada como a preferida dos provadores. Estas características foram intensificadas ao longo dos 3 meses, sendo bastante notórias na última análise. Por outro lado, as amostras de vinagre preparadas com água do furo foram classificadas com um sabor bastante forte e agressivo. As diferenças entre amostras com e sem sulfuroso também foram perceptíveis para os provadores, sendo as amostras com

sulfuroso consideradas desagradáveis e com sabor a ‘enxofre’, sendo que foram consideradas como as piores do teste.

Quanto à percepção da cor nos vinagres, foi feito um acompanhamento visual das amostras ao longo dos três meses. Não foram identificadas diferenças entre as amostras elaboradas com os dois tipos de água. Contudo, verificou-se a diminuição da intensidade de cor das amostras com sulfuroso em comparação com as mesmas amostras sem sulfuroso, tanto nas de sidra como nas de vinho. Ao fim dos 3 meses, os vinagres com sulfuroso estavam praticamente límpidos, uma característica desejável para o vinagre (Fig.13).

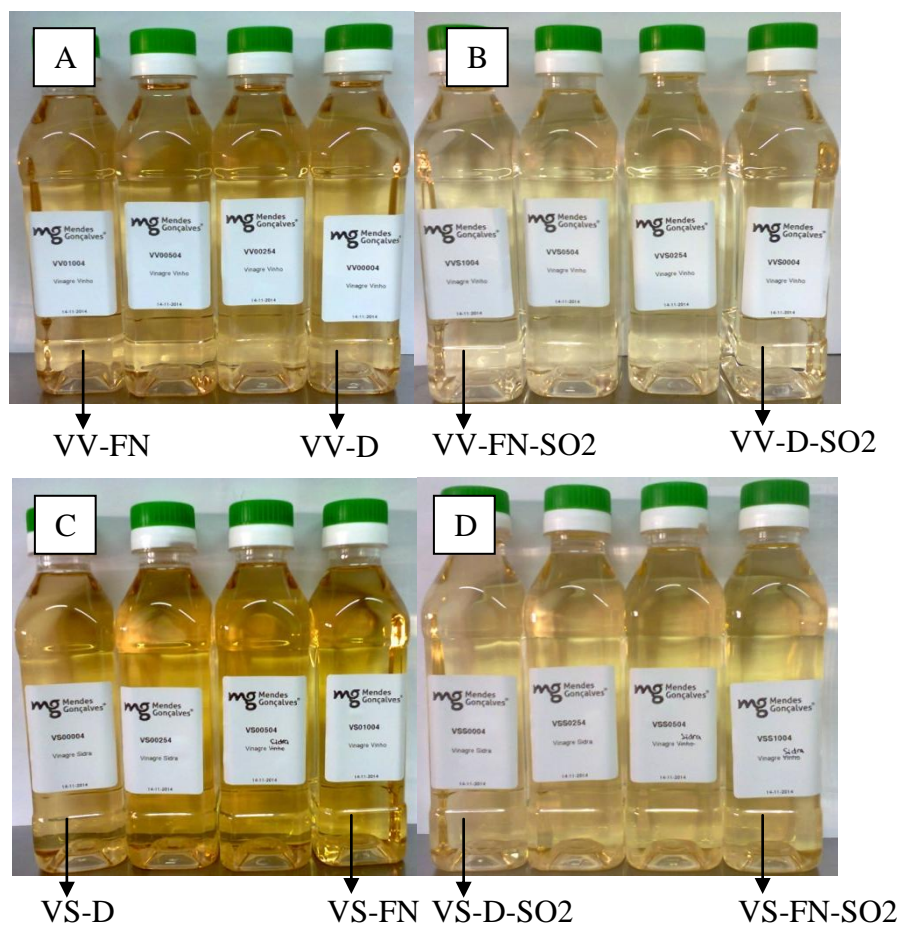


Fig. 13: Amostras de Vinagre de Vinho sem sulfuroso (A); Vinagre de Vinho com sulfuroso (B); Vinagre de Sidra sem sulfuroso (C); Vinagre de Sidra com sulfuroso (D), desdobrados com diferentes águas ao fim de 3 meses.

A perda de cor das amostras pode ser resultado da reação de alguns compostos fenólicos presentes no vinagre com o dióxido de enxofre, havendo formação de compostos incolores (branqueamento do vinagre). Por exemplo, a um pH de 3,2, 96% do anidrido sulfuroso consiste em aniões de  $\text{HSO}_3^-$  (bissulfito) que reagem com o catião flavílio, sendo o produto formado incolor (69,72).

#### **4.2.3. Formação de depósito**

Neste parâmetro houve diferenças entre os dois tipos de vinagre, sendo que as amostras de vinho mantiveram-se estáveis ao longo dos três meses, não havendo formação de depósitos nem nas amostras diluídas com água destilada nem com água do furo com e sem sulfuroso.

Contrariamente, as amostras de sidra apresentaram-se mais instáveis havendo formação de depósito logo ao fim do primeiro mês nas amostras produzidas com água do furo e com adição de sulfuroso. A análise visual qualitativa pareceu indicar que o depósito foi aumentando ao longo dos três meses. Na literatura é referido que nos vinhos na presença de uma quantidade significativa de cobre e sulfitos podem ser formados complexos de sulfitos-cobre e proteína-cobre (38), o que pode explicar a formação de precipitados apenas no vinagre com sulfuroso ao fim de algum tempo de engarrafamento. As restantes amostras (com água destilada com e sem sulfuroso) mantiveram-se estáveis ao longo do tempo, não havendo formação de depósito.

O depósito formado foi analisado e não foi possível identificar a presença de compostos fenólicos. Por outro lado, foi possível quantificar o teor proteico no Vinagre de Cereal, sendo de 13,72  $\mu\text{g/mL}$ . Consequentemente, podemos inferir que o depósito formado nos vinagres poderá conter alguma proteína, contudo deverão se feitos mais testes para validação da hipótese.

### **4.3. Influência das características da água na fermentação**

No ensaio anterior, a influência da água nas características do vinagre só foi avaliada a partir do desdobramento de um *vinagre duplo*, em que a água é só um meio de diluição. Consequentemente foi realizado um ensaio de forma a verificar qual a influência da água nas características do vinagre, no processo de produção, nomeadamente durante a fermentação acética. Neste estudo foi feita a fermentação acética de um fermentado de cereal de cerca 13,1° de álcool, à escala piloto. A fermentação decorreu até se obter um

grau de álcool de 0,3°. De forma a produzir resultados próximos da aplicação futura do tratamento de água, foi feita uma diluição da água do furo novo com 62% de água destilada para que a água utilizada tivesse as características semelhantes à água do furo novo tratada por osmose inversa (Tabela 4). Os resultados foram comparados com amostras produzidas em acetatores industriais na mesma altura e com a água do FV.

Tabela 4: Valores de alguns parâmetros físico-químicos da água do furo novo com 62% de água destilada.

Parâmetro	Valores
pH	7,0
Condutividade	200 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Nitratos	25 ppm $\text{NO}_3^-$
Dureza Total	75 ppm

#### 4.3.1. Análise Físico-Química

Após a fermentação os vinagres duplos obtidos foram diluídos com as respectivas águas utilizadas na fermentação, obtendo-se uma acidez de 5%. Os mesmos vinagres foram produzidos com e sem sulfuroso. As amostras foram acompanhadas físico-química e sensorialmente, durante 1 mês.

As amostras com sulfuroso apresentaram maior turvação (Tabela 5) e uma maior variação total da cor (Fig.14), contrariamente às amostras sem sulfuroso. Relativamente à variação total da cor as amostras com sulfuroso demonstraram uma perda de cor ao longo do tempo, devido à formação de compostos incolores no vinagre, como explicado anteriormente. As amostras com água do FN apresentaram uma menor turvação relativamente às amostras elaboradas com água do FV, devido a uma menor turvação da água utilizada. Relativamente à variação total de cor, não houve diferenças significativas entre os dois tipos de água.

Tabela 5: Variação de pH ( $T=20^\circ\text{C}$ ) das amostras de Vinagre de Cereal 5%, elaborados com diferentes águas, ao início e ao fim de um mês (FV-SO2 – Água Furo Velho, c/



sulfuroso; FV - Água Furo Velho, s/ sulfuroso; FN- SO2- Água Furo Novo, c/ sulfuroso; FN V2 - Água Furo Novo, s/ sulfuroso).

Amostra	Dias	pH (20°C)		Turvação (NTU)	
		1	31	1	31
FV –SO2		2,64	2,58	0,56	0,61
FV		2,62	2,62	0,23	0,17
FN-SO2		2,58	2,55	0,25	0,29
FN		2,56	2,56	0,12	0,13

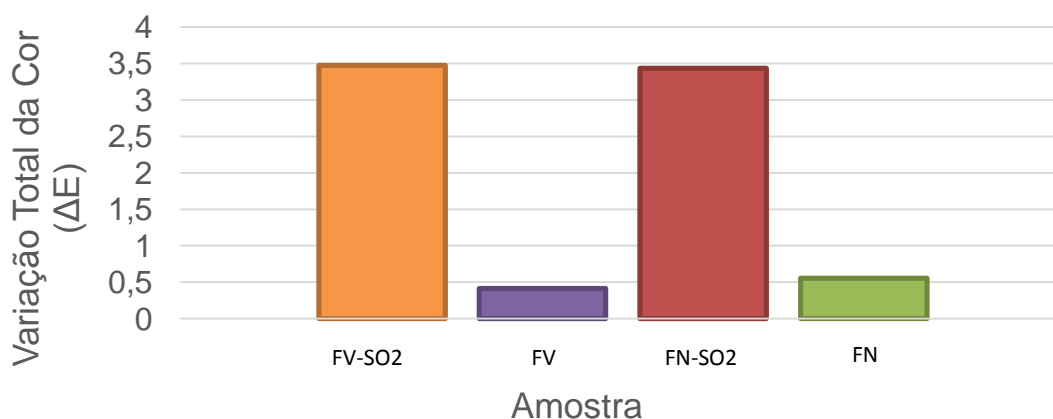


Fig. 14: Variação Total da Cor ( $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$ ) das amostras de Vinagre de Cereal 5% elaborado com água do Furo Velho FV-SO2 e FV (sem SO<sub>2</sub>); e com água com características da água de Osmose FN - SO2 e FN (sem SO<sub>2</sub>).

Neste estudo podemos observar que a nível de turvação, a água FN+água destilada será uma mais-valia, garantindo assim um vinagre mais límpido.

#### 4.3.2. Acompanhamento Sensorial

Um pequeno grupo de provadores avaliou sensorialmente os vinagres ao longo de 2 meses de armazenamento. Inicialmente não foram verificadas diferenças a nível sensorial nas diferentes amostras. Contudo, ao fim de um mês, as amostras de vinagre produzidas com água correspondente à água do furo novo diluída com água destilada foram consideradas mais suaves, sendo a diferença mais notória no caso das amostras sem sulfuroso. Nas amostras com sulfuroso era identificado o sabor a enxofre. Em todas as amostras analisadas não foi observado a formação de depósito (Fig.15).

Ao nível da formação de depósito, será importante fazer um acompanhamento mais prolongado para poder inferir qual a influência da água na formação de depósito ao nível do estudo da influência nas fermentações.

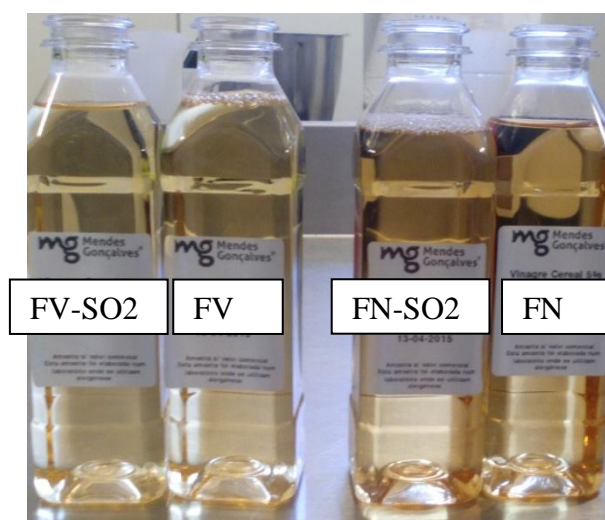


Fig.15: Amostras de vinagre de cereal 5% elaborados com água do FV e com água FN+água destilada (FV-SO<sub>2</sub> (V1): água FV com sulfuroso; FV (V2): água FV sem sulfuroso; FN-SO<sub>2</sub> (V3): água FN com sulfuroso; FN (V4): água FN sem sulfuroso).

#### 4.4. Viabilidade de aplicação de Filmes de Quitosana em Vinagres

A adição dos filmes de quitosana-genipina foi feita na altura da diluição do vinagre, tal e qual como é feito aquando da adição do anidrido sulfuroso.

##### 4.4.1 Análise físico-química

As amostras de vinagre de Sidra 5% com sulfuroso (SO<sub>2</sub>) não apresentaram diferenças significativas relativamente à variação total de cor (Fig.16) entre os diferentes tempos de recolha (3, 6, 8, 12 dias). No entanto, ao longo dos dois meses, verificou-se uma diminuição da tonalidade e cromaticidade (a\* e b\* - CIELab) das amostras com sulfuroso,

comparativamente à amostra controlo (sem adição de conservante), possivelmente pelo efeito explicado anteriormente pela combinação dos compostos fenólicos com o dióxido de enxofre.

Por outro lado, as amostras com quitosana, demonstraram diferenças significativas relativamente à variação total de cor, dependendo do tempo em contacto com o filme, sendo menor a variação de cor das amostras que estiveram menos tempo em contacto com a quitosana, isto é, verificou-se menor alteração de cor das amostras relativamente às amostras controlo (Fig.16). Quanto às amostras Q-3 e 6 dias foram as que mantiveram uma variação de cor próxima à amostra controlo ao longo dos dois meses.

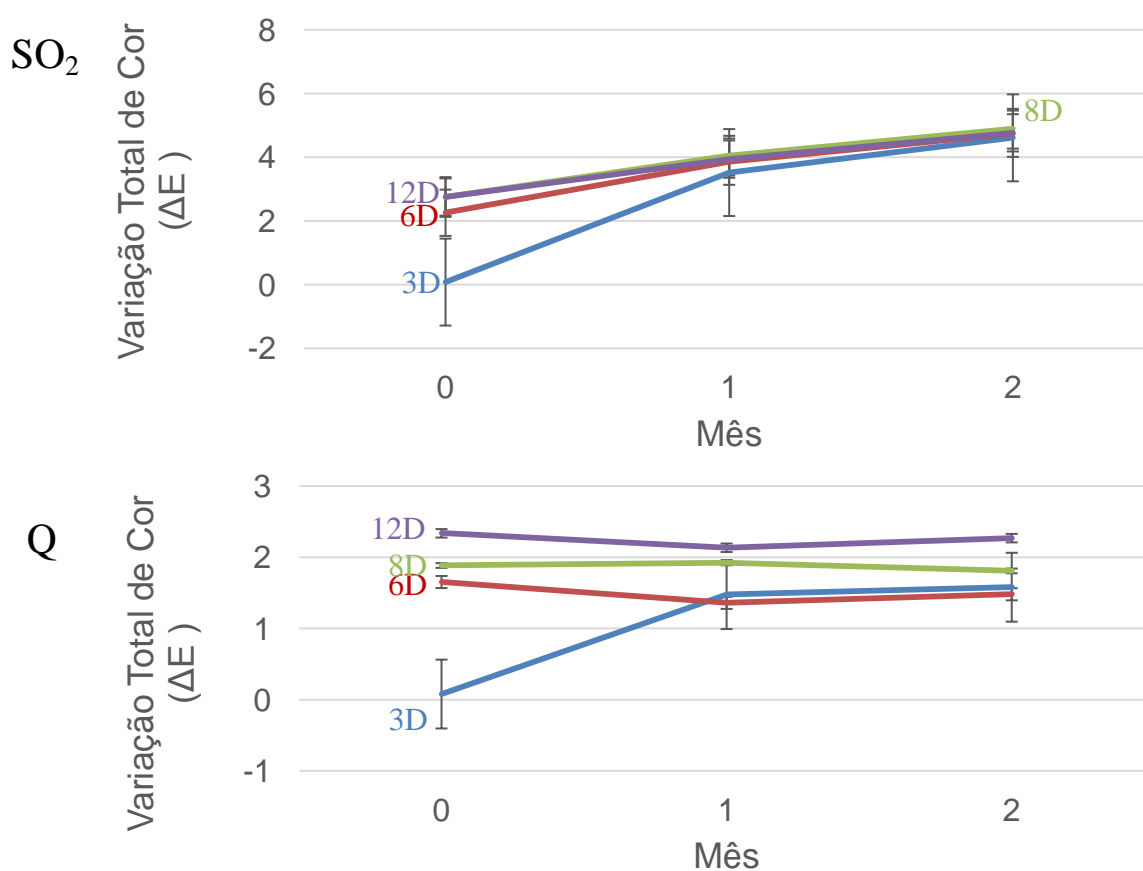


Fig. 16:Variação Total de Cor ( $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$ ) das amostras de Vinagre de Sidra 5%,com Sulfuroso (SO<sub>2</sub>) ou Quitosana (Q) ao longo de 2 meses (amostras recolhidas ao dia 3 (3D), dia 6 (6D), dia 8 (8D) e dia 12 (12D)).

A aplicação dos filmes de Quitosana demonstrou uma maior preservação de cor dos vinagres, comparativamente à utilização do sulfuroso. Em média, as amostras com

quitosana apresentaram uma variação total de cor de 1,6, enquanto as amostras com sulfuroso de 3,5.

Relativamente à turvação, o comportamento das amostras com sulfuroso foi bastante diferente comparando com a quitosana. Estas últimas demonstraram uma diminuição da turvação ao longo dos dois meses, contrariamente às amostras com sulfuroso que demonstraram uma maior turvação comparativamente à amostra controlo. Dentro das amostras com quitosana, quanto maior o tempo de contacto com o filme, menor a turvação da amostra. É de salientar que ao final do segundo mês houve um decréscimo da turvação nas amostras com sulfuroso, possivelmente devido ao início de formação de depósito (Fig.17).

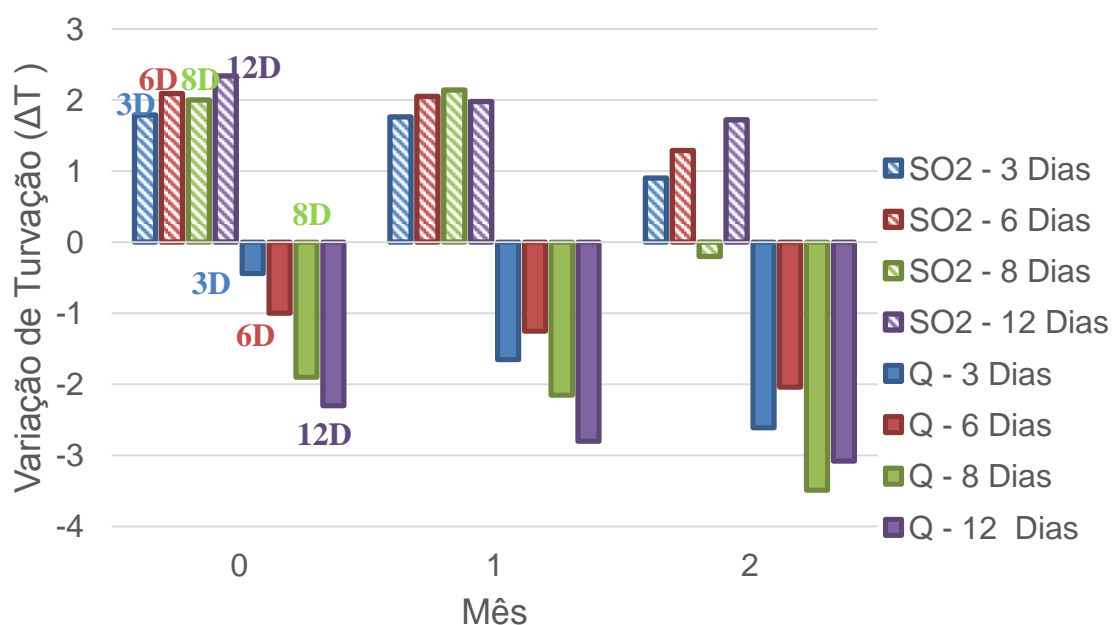


Fig.17: Variação de Turvação (NTU) dos Vinagres de Sidra 5% com Sulfuroso (SO2) e com Quitosana (Q), com diferentes tempos de recolha (3,6,8,12 dias) ao longo de dois meses de estudo.

A formação de depósito foi verificada ao fim de um mês do estudo, em todas as amostras com Quitosana (Q-3 dias, Q-6 dias, Q-8 dias, Q-12 dias) (Fig.18). A quantidade de depósito era semelhante em todas as amostras.. No segundo mês, foi observada a mesma situação, sendo somente as amostras de quitosana que apresentavam depósito,

havendo um aumento de quantidade em todas as amostras. O depósito dissolvia-se ao ser agitada a amostra, demorando algum tempo até se depositar novamente.

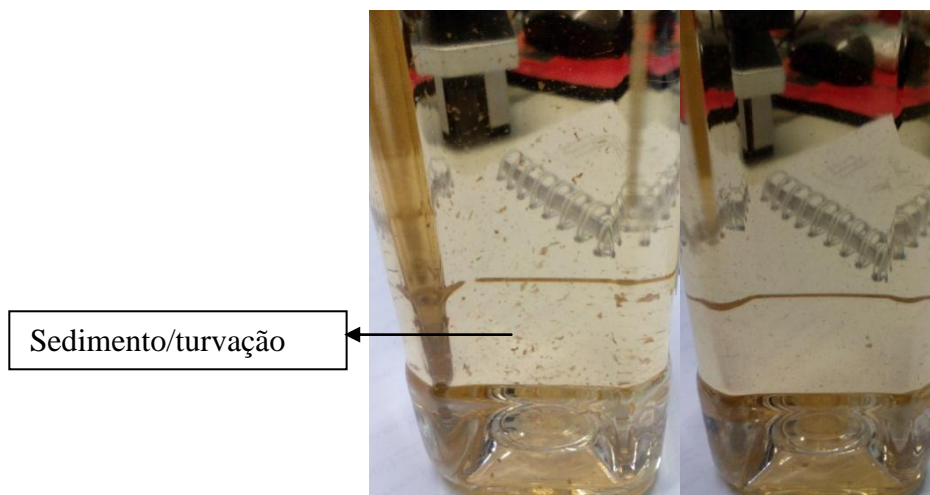


Fig.18: Amostras de vinagre de sidra com aplicação do filme de quitosana ao fim de um mês, onde é observável a formação de depósito.

#### 4.4.2 Análise Sensorial

As diferentes amostras foram dadas a provar a provadores de forma a analisarem as possíveis diferenças entre as amostras em relação à amostra controlo. Inicialmente (mês zero) não foram notadas diferenças muito significativas entre as diferentes amostras, contudo as amostras com quitosana eram descritas como tendo um sabor mais suave comparativamente ao controlo. As amostras com sulfuroso foram consideradas deslavadas, suaves e com sabor pouco frutado. O sabor/odor a enxofre foi identificado nas amostras ao fim de 12 dias. Ao fim do oitavo dia já era perceptível a perda de cor das amostras com sulfuroso, sendo mais significativa ao fim do décimo segundo dia (Fig.19). Contrariamente, as amostras com quitosana mantiveram uma cor próxima do controlo e ainda mais límpidas. A limpidez foi proporcional ao tempo de contacto com os filmes de quitosana, sendo maior ao fim dos 12 dias.



Fig.19: Amostras de vinagre de sidra 5% elaboradas com água do FN, com Sulfuroso (Metabissulfito-FN), controlo e com Quitosana com 12 dias de estudo.

Ao fim de um mês, as amostras voltaram a ser provadas, sendo que as diferenças foram mais significativas nas amostras com mais tempo de contacto com os filmes de quitosana. Nas amostras Q-8 dias e Q-12 dias foi identificado um sabor diferente do controlo, mas não desagradável. Todas as amostras com sulfuroso foram consideráveis desagradáveis, com sabor e odor a enxofre. A nível visual as amostras com quitosana apresentavam-se semelhantes ao controlo, contudo mais límpidas. Quanto às amostras com sulfuroso tinham uma cor bastante clara, considerada pouco natural. Nesta análise mensal foram as amostras controlo as mais apreciadas, sendo consideradas mais frutadas.

No segundo mês, as diferenças mantiveram-se exceto na amostra Q-12 dias que tinha um sabor mais agressivo/desagradável em relação ao controlo. As amostras com sulfuroso continuaram a ser consideradas desagradáveis e piores ao nível gustativo e visual. Consequentemente, é possível inferir que a exposição prolongada do vinagre aos filmes de quitosana não será benéfica para a obtenção das características desejadas do vinagre (sabor suave/aromático).

O filme de quitosana revelou ser eficiente na conservação das características do vinagre ao longo do armazenamento, sendo mais vantajoso que o sulfuroso. Por outro lado, parece promover a deposição do material em suspensão, o que pode ser vantajoso pois pode ocorrer ainda nos contentores e antes do embalamento do vinagre.

#### 4.5. Influência da água nas características e estabilidade físico-química e sensorial da maionese

Da mesma forma que nos vinagres, foi realizado um ensaio para perceber a influência da água nas características e estabilidade de um molho/tempero. Para tal foi escolhida uma emulsão, a maionese, com reduzida percentagem de gordura (24%) e grande quantidade de água (57%). As amostras foram elaboradas com dois tipos de água, água destilada e água proveniente do Furo Novo (Tabela 6). No mesmo ensaio ainda foram feitas amostras com e sem EDTA, de forma a analisar a capacidade quelante deste composto. Este agente quelante forma complexos estáveis com iões metálicos como o ferro, magnésio e cálcio, inibindo/retardando a oxidação lipídica. Foram feitas análises sensoriais, físico-químicas e microbiológicas mensalmente das amostras. Ainda foram colocadas duas amostras de cada maionese na estufa a 40°C com 75% de humidade, durante 3 meses, de forma a acelerar o processo de armazenamento, correspondendo a 9 meses à temperatura ambiente.

Tabela 6: Características físico-químicas das águas utilizadas na produção das maioneses em estudo.

Água	pH (T°C)	Condutividade (uS/cm)
Furo Novo	7,78 (19,0°C)	471
Destilada	5,82 (19,1°C)	0

##### 4.5.1. Caracterização físico-química

Ao longo do estudo de estabilidade as maioneses elaboradas com água destilada apresentaram um pH ligeiramente mais baixo que as maioneses com água do Furo, devido ao menor pH da água utilizada na sua produção. No que diz respeito à viscosidade das maioneses esta foi semelhante entre os dois tipos de maionese (água destilada e água furo, com e sem EDTA). Ao nível da cor (Fig.20), a maionese elaborada com água do furo novo apresentou uma maior variação de cor relativamente à amostra tempo zero que a maionese

com água destilada. Neste critério, ao longo dos três meses foi a maionese feita com água destilada e com EDTA que se apresentou mais estável no que diz respeito à cor, isto é apresentou uma menor variação total de cor.

Contrariamente aos vinagres, as maioneses não apresentaram diferenças significativas entre os dois tipos de água, com e sem EDTA, no que diz respeito aos parâmetros físico-químicos.

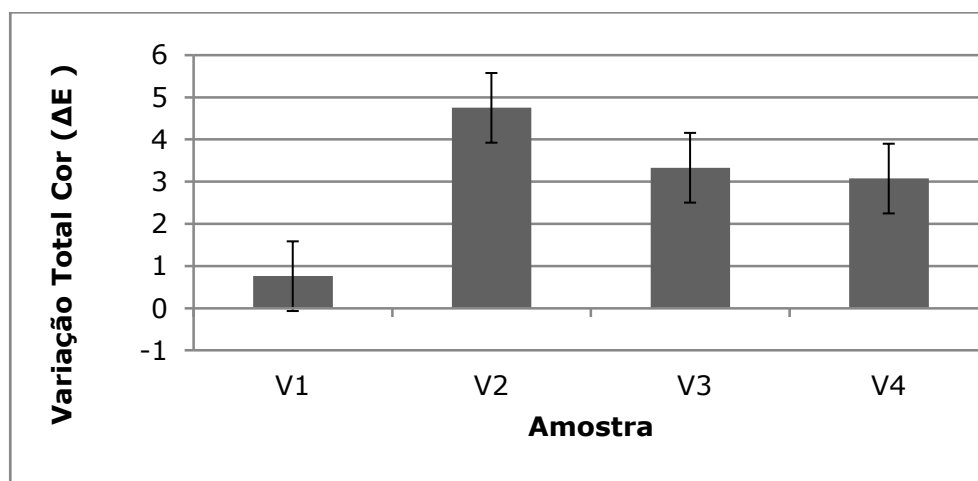


Fig. 20: Variação Total de Cor ( $\Delta E$ ) das amostras de Maionese - V1: Destilada + EDTA, V2: FN + EDTA, V3: Destilada, V4: FN; ( $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$ ).

#### 4.5.2. Análise microbiológica

Foram realizadas análises microbiológicas aos 4 tipos de maioneses durante 9 meses. Os resultados obtidos relativamente a BAL (bactérias ácido lácticas), *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras, foram de  $< 10$  UFC (Unidades Formadoras de Colónias) ao longo dos 9 meses, isto é, número não identificável de colónias. Contrariamente, relativamente aos microrganismos a 30 °C houve variação do UFC (Tabela 7). A amostra elaborada com água destilada e EDTA apresentou inicialmente 80 UFC/g, sendo que após o mês zero não foram identificadas colónias. Contrariamente, a maionese com água furo novo e com EDTA, apresentou crescimento de microrganismos a 30 °C ao fim dos 9 meses (240 UFC/g). As amostras sem EDTA apresentaram um valor inicial de UFC inferior às amostras com EDTA, sendo que no fim dos 9 meses não apresentavam contaminação.



Tabela 7: Análise microbiológica das maioneses em estudo.

Amostra	MOs 30°C (UFC/g) Mês 0	MOs 30°C (UFC/g) Mês 1	MOs 30°C (UFC/g) Mês 3	MOs 30°C (UFC/g) Mês 9
Destilada +EDTA	8,0E+01	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1
FN +EDTA	8,0E+01	1,0E+01	<1,0E+1	2,4E+02
Destilada	2,0E+01	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1
FN	<1,0E+1	5,0E+01	1,0E+1	<1,0E+1

De acordo com os resultados microbiológicos as maioneses com menor estabilidade microbiológica foram as elaboradas com a água do Furo Novo. Ao fim dos 9 meses as maioneses sem EDTA não apresentavam desenvolvimento de microrganismos, enquanto na amostra de maionese com água do furo com EDTA foi identificado o crescimento de microrganismos.

#### 4.5.3. Acompanhamento Sensorial

O acompanhamento sensorial foi feito por um pequeno grupo de provadores ao longo do armazenamento das maioneses. Nestas provas apenas foi dado a provar as diferentes maioneses, não havendo qualquer tipo de teste e folha de prova. Foi pedido aos provadores para avaliarem as diferenças entre as diferentes amostras.

As maioneses (Fig.21) feitas com água destilada (com EDTA) apresentaram um melhor sabor ao longo do tempo, sendo caracterizadas como mais saborosas que a maionese com água do Furo. As amostras sem EDTA apresentaram sabor rançoso ao terceiro mês após a elaboração, sendo mais significativo na amostra com água do furo novo. A ausência de um agente quelante, como o EDTA, é aceleradora do processo de oxidação lipídica. Ao fim dos 9 meses as amostras com água destilada com EDTA apresentavam-se com um bom sabor, sendo que as amostras com água do furo com EDTA tinham ligeiro sabor a ranço. A oxidação lipídica das amostras com água de furo poderá resultar de uma maior quantidade de iões existentes nesta água, como o ferro, necessários para o processo de

oxidação lipídica, indicando que o agente quelante adicionado não foi suficiente para inibir este tipo de reações.

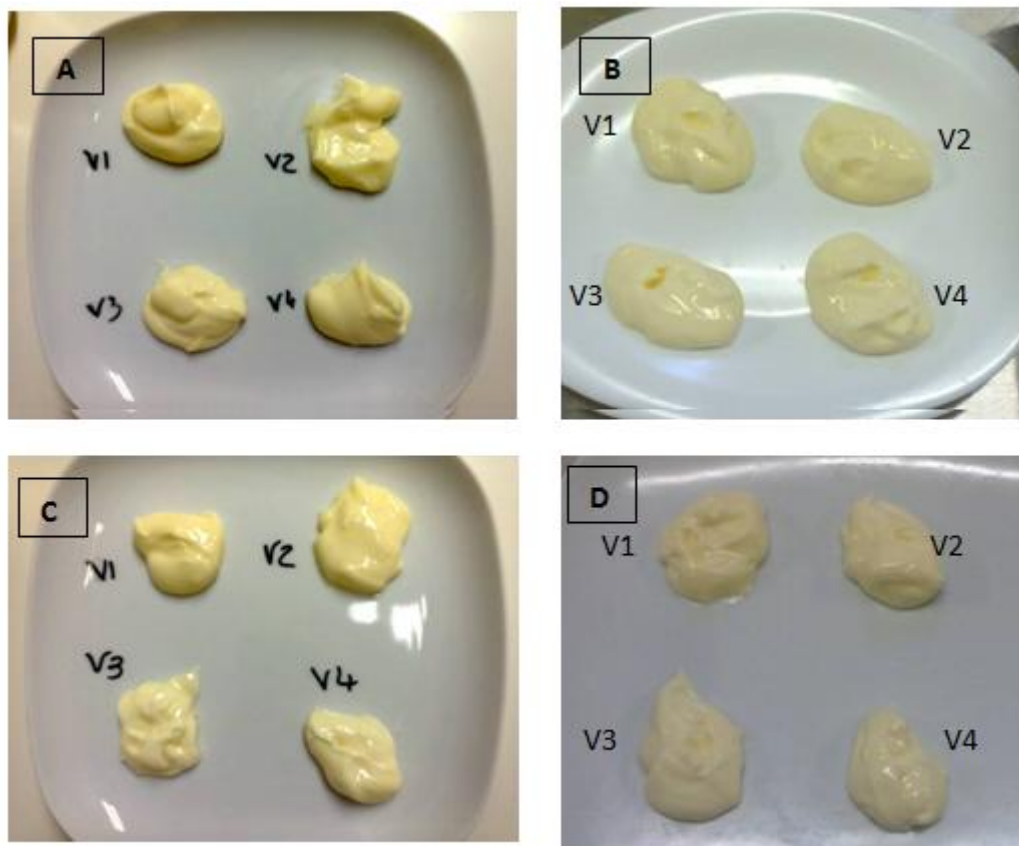


Fig.21:Maionese V1: Destilada + EDTA, V2: FN + EDTA, V3: Destilada, V4: FN; A) com 1 Mês B) com 3 meses C) com 4 meses e D) com 9 meses.

#### 4.6. Aplicação de Filmes de Quitosana no tratamento de água

A amostra de água utilizada no estudo (Tabela 8) foi recolhida num frasco (1000 mL) previamente esterilizado sendo colocado de seguida, o filme de quitosana (área útil 144 cm<sup>2</sup>) de forma a minimizar possíveis contaminações. Ainda foi preparada uma amostra controlo de água também num frasco esterilizado (1000 mL). Quanto ao parâmetro microbiológico, foram obtidos 120 UFC/mL de microrganismos, na amostra de água antes da aplicação do filme de quitosana.

Tabela 8: Características físico-químicas da água recolhida antes da aplicação do filme de quitosana.

Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	TDS (ppm)	NaCl (%)	Cloro residual (ppm)	pH ( $^{\circ}\text{C}$ )	Turvação (NTU)
1140	570	1,9	0	6,74 (13,3 $^{\circ}\text{C}$ )	0,65

As amostras controlo e com o filme quitosana foram analisadas ao nível físico-químico e microbiológico ao fim de 72 horas e passado uma semana. As duas amostras não apresentaram diferenças significativas ao nível da condutividade (Fig.22) e teor total de sólidos dissolvidos (TDS). Contudo, passado uma semana a água com quitosana apresentou um aumento significativo de turvação (percetível pelo olho humano), devido ao crescimento microbiano.

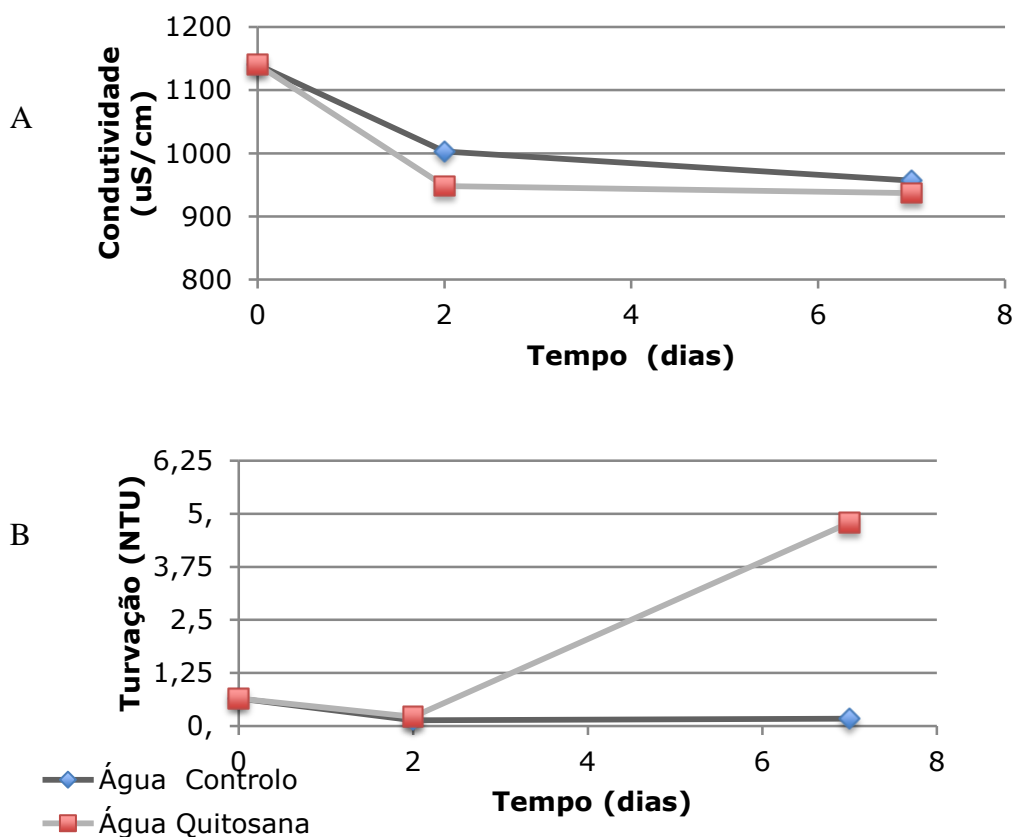


Fig.22: Valores de condutividade (A) e turvação (B) das amostras de água controlo (sem quitosana) e de água com quitosana, ao fim de dois e 7 dias de contato.

A nível de parâmetros microbiológicos (Tabela 9) verificou-se que ao fim de 2 dias de contacto com o filme de quitosana houve uma diminuição de contagem de microrganismos comparativamente à amostra controlo. Contudo, foram repetidas as análises microbiológicas ao fim de 1 semana e foi observado um aumento de microrganismos na amostra com quitosana comparativamente à amostra controlo.

Tabela 9: Resultados de análise microbiológica de amostra controlo (sem quitosana) e amostra com quitosana com 2 e 7 dias.

Microrganismo 30°C (UFC/mL)	2 dias	7 dias
Água Controlo	1,8 E+3	3,0 E+3
Água c/ Quitosana	8,5 E+2	1,2 E+4

A utilização de filmes de quitosana no tratamento de água poderá ser uma forma de diminuição de contaminantes microbianos. Contudo a sua utilização deverá ser otimizada ao nível de tempo de contato da quitosana com água, visto que nos resultados obtidos um tempo de 7 dias de contacto da quitosana com a água levou ao aumento de microrganismos relativamente à amostra controlo (sem quitosana).

## **5. Conclusões e novas perspectivas de trabalho**

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a água apresenta uma influência nas características sensoriais dos vinagres, contudo esta influência poderá ser diferente dependendo da matéria-prima utilizada. No caso do vinagre de sidra foram identificadas diferenças nos vinagres elaborados com as diferentes águas logo ao fim do primeiro mês (sabor mais suave e mais aromático, cor desejável, ausência de sedimento), contrariamente aos vinagres de vinho que se apresentaram mais estáveis ao longo do estudo. As amostras elaboradas com água destilada apresentavam melhores características sensoriais e a formação de depósito nestas amostras não foi verificada ao longo do armazenamento. A água destilada permitiu uma maior estabilidade físico-química e sensorial dos vinagres de sidra e vinho, o que indica que existe potencial em utilizar uma água tratada por osmose inversa. Uma água com estas características (baixa condutividade, baixo teor de nitratos, baixa dureza, baixa turvação e com menor número de TDS) permite obter um vinagre mais suave e com as suas características sensoriais mais agradáveis, isto é, aromas e compostos de sabor identificativos deste tipo de amostras. Os vinagres com água destilada não apresentaram formação de depósito ao longo do armazenamento, contrariamente aos vinagres elaborados com a água do furo novo que logo ao fim do primeiro mês já apresentavam formação de depósito.

Relativamente à influência das características da água no processo de fermentação do vinagre, deverá ser realizado um acompanhamento físico-químico e sensorial dos produtos por um maior período de tempo, pois devido aos poucos resultados obtidos, não é possível inferir acerca da estabilidade físico-química e sensorial do vinagre a longo prazo. Contudo, não será uma mais-valia para a empresa a utilização da água tratada por osmose ao nível das fermentações acéticas devido à necessidade por parte das bactérias de nutrientes existentes numa água não tratada por osmose, para além do seu custo ser mais elevado.

No estudo da influência da água nas características sensoriais e físico-químicas da maionese, não foram verificadas diferenças ao nível das características microbiológicas. Ao nível sensorial e estabilidade de cor, a maionese com água destilada apresentou um melhor sabor e uma maior estabilidade. Contudo os resultados são pouco demonstrativos da possível influência da água em molhos e emulsões, visto cada um ter as suas

características (ingredientes diferentes com influências diferentes entre eles na estabilidade físico-química da emulsão) e atividade de água.

Pelos resultados obtidos é possível inferir que é de grande importância adequar as características da água de forma a garantir uma qualidade sensorial, físico-química e microbiológica dos produtos. A utilização de uma água tratada por osmose inversa poderá ser uma mais-valia em alguns produtos da empresa. A formação de depósitos/nébulas nos vinagres poderá ser retardada ou até mesmo prevenida com a utilização de uma água com estas características. Por outro lado, a rancificação de molhos e emulsões poderá ser retardada, tal como a otimização das características físico-químicas e sensoriais de molhos e emulsões, visto haver uma menor concentração de sais catalisadores da oxidação lipídica numa água de osmose inversa.

No caso do estudo de viabilidade da aplicação de filmes de quitosana em vinagre, foi possível verificar que as amostras com os filmes de quitosana apresentaram uma menor variação de cor relativamente à amostra controlo e, por outro lado, apresentaram uma menor turvação comparativamente às amostras preparadas com dióxido de enxofre. Consequentemente os filmes de quitosana poderão ser utilizados para diminuição da turvação dos vinagres, mantendo-os límpidos e com a cor original. A aplicação dos filmes de quitosana no vinagre acelerou o processo de formação de depósito, isto é, o aparecimento de depósito nas amostras com quitosana ocorreu logo ao fim de 1 mês enquanto as amostras controlo e com sulfuroso não desenvolveram qualquer tipo de depósito, mas apresentaram turvação, o que pode ser vantajoso pois o depósito pode ser mais facilmente removido antes do embalamento do vinagre do que a turvação.

Os resultados obtidos permitem assim concluir que a quitosana tem um efeito precipitante de compostos causadores de turvação dos vinagres, tornando-os límpidos. A aplicação dos filmes de quitosana nos vinagres poderá ser uma possibilidade de substituição do conservante atualmente utilizado, o dióxido de enxofre. Contudo será ainda necessário compreender as reações e mecanismos envolvidos entre a quitosana e os compostos do vinagre que permitem a conservação deste ao longo do armazenamento. Assim como perceber o motivo pelo qual os filmes de quitosana aceleram a formação de depósito no vinagre.

## 6. Referências Bibliográficas

1. Simpson, BK, *Food Biochemistry an Food Processing*, Wiley-Blackwell, 2012.
2. Kasaai, MR, *Use of Water Properties in Food Technology: A Global View*, Taylor & Francis, 2014, 1034–54.
3. Kirby, RM;Bartram, J.; Carr, R.; *Water in food production and processing: quantity and quality concerns*, Food Control, 2003, 283–99.
4. Belitz, H-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.; *Food Chemistry*, Springer, 4th Edition, 2009.
5. Ribeiro, EP.; Seravalli, EAG.;*Química dos Alimentos*, Edgard Blu, 2007.
6. McClements, DJ., *Food Emulsions - Principles, Practices and Techniques*, Second Edition, London, 2005.
7. Sun, D-W., *Handbook of Food Safety Engineering*, Wiley - Blackwell, 2012
8. Rockland, Louis B., Stewart, George F., *Water Activity: Influences on Food Quality: A Treatise on the Influence of Bound and Free Water on the Quality and Stability of Foods and Other Natural Products*, Elsevier Science, 2013, p. 950.
9. Roos, Yrjö H., *Water activity and physical state effects on amorphous food stability*. Journal Food Process Preservation, 1993, 16(6):433–47.
10. Mathlouthi, M., *Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs*, Food Control, 2001, 12(7):409–17.
11. Pagni, R., *Food: The Chemistry of Its Components*, 4th Edition, Chemical Education, American Chemical Society, 2004, 81(1):39.
12. Lewicki, P.P., *Water as the determinant of food engineering properties. A review*. Journal Food Engineering, 2004, 61(4):483–95.
13. Pereira, MCVJM, *Planos de segurança da Água para consumo humano em sistemas públicos de abastecimento (ERSAR)*, 2005.
14. Wujie, Zhufei, Xujing, *The Influence of Water Quality on Food Quality and the Treatment of Water for Food Processing*, Procedia Environmental Science, 2011, 10:2671–6.
15. Rosa, M.J., Vieira, P., Menaia, J., *Série Guias Técnicos - 13 : O tratamento de água para consumo humano face à qualidade da água de origem*, ERSAR, 2009.
16. Simas, L., Gonçalves, P., Leal, J., Alexandre, C., *Controlo da qualidade da água para consumo humano em sistemas públicos de abastecimento*, ERSAR, 2005.
17. Nacional C. Decreto-Lei nº306/2007 de 27 agosto. Diário da República 1ª série, N°164:5747–65.
19. Katsoyiannis, I.A., Zouboulis, A.I., *Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters*, Water Residues, 2004, 38(1):17–26.
20. Moura, Camila; Soares, Diogo; Ribeiro, Inês; Coutinho, João; Coutinho, Mafalda; Bernardo, Tomas; *Processo de ultrafiltração e a sua aplicação em águas residuais*, Projeto FEUP 1ºano curricular – Mestrado integrado de Engenharia do Ambiente.
21. Silva, Hélder F.S., Tese de Mestrado - *Estudo do tratamento de águas residuais da*

*fábrica 1 da Renova*, Universidade de Aveiro, 2013.

22. *Guidelines for Drinking-water Quality*, World Health Organization, Fourth Edition, 2011.
23. Greenlee, Lauren; Lawler, Desmond; Freeman, Benny; Marrot, Bennoit; Moulin Phillipe, *Reverse osmosis desalination: water sources, technology, and today's challenges*, Water Residues, 2009, 43(9):2317–48 .
24. Fritzmann, C.; Löwenberg, J.; Wintgens, T.; Melin, T.; *State-of-the-art of reverse osmosis desalination*, Desalination, 2007, 216(1–3):1–76.
25. Malaeb, L.; Ayoub, G.M.; *Reverse osmosis technology for water treatment: State of the art review*. Desalination, 2011, 267(1):1–8.
26. Dijk, J.Q.J.C; Van, J.C; Moel, V.M.P; Verberk; *Drinking Water - Principles and Practices*, editor: World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd., 2006.
27. *UNICEF Handbook on Water Quality*, United Nations Children's Foundation, New York, 2008.
28. Young, W.F.; Horth, H.; Crane, R.; Ogden, T.; Arnott, M.; *Taste and odour threshold concentrations of potential potable water contaminants*, Water Residues, 1996, 30(2):331–40.
29. Ridgway, Kathy; Samuel, P.D.; Lalljie, RMS. *Analysis of Food Taints and Off-Flavours - A Review*, Food Additives and Contaminants, 2009, 27 (02): 146–68.
30. Zayas, JF; *Functionality of Proteins in Food*, Springer Science & Business Media, 1996, 373.
31. Tolstoguzov, V.B.; *Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction*, Food Hydrocolloids, 1991, 4(6):429–68.
32. Chou, D.H.; Morr, C.V.; *Protein-water interactions and functional properties*, Journal of the American Oil Chemists' Society, 1979, 56(1):53–62.
33. Kinsella, J.E.; Melachouris, N.; *Functional properties of proteins in foods: A survey*, Taylor & Francis Group, 2009, 7 (3):219-80.
34. Svensson, I.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications*. Biotechnology and bioengineering, 1994, 44(5):549–56.
35. Nollet, L.M.L; Toldra, F.; Benjakul, S.; Paliyath, G.; Hui, Y.H; *Food Biochemistry and Food Processing*, Second Edition. Wiley-Blackwell, 2012.
36. Fisher, A.E.; Naughton, D.P.; Griffiths, H.; Lunec, J.; Kim, S.; Han, J.; et al. *Iron supplements: the quick fix with long-term consequences*. Nutricional Journal, BioMed Central, 2004, 3 (1):2.
37. Mei, L.; McClements, D.J.; Wu, J.; Decker, E.A; *Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl*, Food Chemistry, 1998, 61(3):307–12.
38. Farkaš, J.; *Technology and Biochemistry of Wine, Volume 2*, AMACOM Div American Mgmt Assn, 1988, Vol. 2:744.
39. Brewer, J.M; *Yeast Enolase: Mechanism of Activation by Metal Ion*. Critical Reviews Biochemistry, 1981, 11(3):209-54.




40. Faller, L.D; Baroudy, B.M.; Johnson, A.M.; Ewall, R.X; *Magnesium ion requirements for yeast enolase activity*, Biochemistry, American Chemical Society; 1977 , 16(17), 3864- 9.
41. Ravi, Kumar MN.; *A review of chitin and chitosan applications*, Reactive and Functional Polymers, 2000, 46(1):1–27.
42. Rinaudo, M.; *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science, 2006, 31(7):603–32.
43. Cunha, Ângela da.; Tese de Mestrado - *Desenvolvimento de filmes de quitosana com atividade antioxidante*, 2011, Universidade de Aveiro.
44. Shahidi, F.; Arachchi, J.; Jeon, Y-J. *Food applications of chitin and chitosans*. Trends Food Science Technology, 1999, 10(2):37–51.
45. Dutta, Joydeep; Dutta, Pradio; Kumar, Tripathi; *Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications*, Journal of Scientific & Industrial Research, 2004, 63:20-31.
46. Nunes, Cláudia; Maricato, Élia; Cunha, Ângela; Rocha, Angélica; Santos, Sofia, et al.; *Chitosan–genipin film, a sustainable methodology for wine preservation*. Green Chemistry, 2016, 18(19): 5331-41.
47. Helander, I.; Nurmiaho-Lassila, E.L; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S.; *Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria*, International Journal Food Microbiology, 2001, 71 (2-3):235-44.
48. Vakili, M.; Rafatullah, M.; Salamatinia, B.; Abdullah, A.Z.; Ibrahim, M.H.; Tan K.B.; et al. *Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review*; Carbohydrate Polymers, 2014, 113:115–30.
49. Zeng, D.; Wu, J.; Kennedy, J.F.; *Application of a chitosan flocculant to water treatment*; Carbohydrate Polymers, 2008, 71(1):135–9.
50. Okamoto, Y.; *Analgesic effects of chitin and chitosan*. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(3):249–52.
51. Anitha, A.; Sowmya, S.; Kumar, P.T.S; Deepthi, S.; Chennazhi, K.P; Ehrlich, H.; et al.; *Chitin and chitosan in selected biomedical applications*; Progress in Polymer Science, 2014, 39(9):1644–67.
52. Divakaran, R.; Sivasankara, Pillai V.N.; *Flocculation of river silt using chitosa*;. Water Residues, 2002, 36(9):2414–8.
53. Rabea, E.I; Badawy, M.; Stevens, C.V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W.; *Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action*. Biomacromolecules 2003, 4 (6): 1457-65.
54. Reddy, D.H.K; Lee, S-M; *Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions*; Advances in colloid and interface science, 2013, 201–202:68–93.
55. Hu, C-Y; Lo, S-L; Chang, C-L; Chen, F-L; Wu, Y-D; Ma, J; *Treatment of highly turbid water using chitosan and aluminum salts*; Separation and Purification Technology, 2013, 104:322–6.
56. Nunes, M.L.A; Tese de Bacherelato - *Avaliação da eficiência de diferentes*

- produtos químicos utilizados na coagulação da água*. Universidade federal de rondônia campus de ji-paraná departamento de engenharia ambiental, 2011.
57. Renault, F.; Sancey, B.; Badot, P-M; Crini, G.; *Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach*. European Polymer Journal, 2009, 45(5):1337-48.
  58. Butler, M.F.; Ng, Y-F; Pudney, P.D.A; *Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2003, 41(24):3941-53.
  59. Moura, M.J.; Figueiredo, M.M.; Gil, M.H; *Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels*, Biomacromolecules, 2007, 8(12):3823-29.
  60. Garnica-Palafox, I.M; Sánchez-Arévalo, F.M.; *Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels*. Carbohydrate Polymers, 2016, 151:1073-81.
  61. Nunes, Cláudia; Maricato, Élia; Cunha, Ângela; *et al.*; *Chitosan-caffeic acid-genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media*, Carbohydrate Polymers, 2013, 236-243.
  62. Mi, F-L; Shyu, S-S; Peng, C-K; *Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin*, Journal Polymers Science Part A Polymers Chemistry, 2005, 43(10):1985-2000.
  63. Wood, B.J.B; *Microbiology of Fermented Foods*; Boston; Springer US; 1997.
  64. Solieri, Laura; Giudici, Paulo; *Vinegars of the World*, Springer, Itália, 2009.
  65. Madan, V.; Walker, S.L.; Beck, M.H.; *Sodium metabisulfite allergy is common but is it relevant? Contact Dermatitis*, 2007, 57(3):173–6.
  66. Batt, C.; *Encyclopedia of Food Microbiology*; 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, New York, 2014.
  67. Depree, J.; Savage, G.; *Physical and flavour stability of mayonnaise*; Trends Food Science Technology; 2001, 12(5–6):157–63.
  68. Witt, K.; *CIE Color Difference Metrics*; Colorimetry, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, p. 79–100.
  69. Ribéreau-Gayon, P; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D.; *Handbook of Enology Volume 2 - The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*; John Wiley; 2006.
  70. Sigma-Aldrich. *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit Technical Bulletin*. 2012;1–6.
  71. *An Introduction to SO 2 Management*. Available from: [www.MoreWine.com](http://www.MoreWine.com)
  72. Bakker, J.; Timberlake, C.F.; *The Mechanism of Color Changes in Aging Port Wine*. American Journal of Enology and Viticulture; 1986; 37(4).
  73. *Enzymes for Brewers (II: Function)*; Available from: <http://beerandwinejournal.com/enzymes-ii/>.

## Anexo I

### Ficha de Prova

**Mendes  
Gonçalves<sup>®</sup>**

Teste Triangular

Produto em análise: Vinagre de Sidra

Duas amostras são iguais e outra é diferente. Selecione o código da amostra que pensa ser diferente.

☐ 372 ☐ 594 ☐ 681 ☐ Não deteto diferenças.

Caso tenha detetado diferenças, explique a sua escolha.

## Anexo II

Table A.1 — Minimum number of correct responses needed to conclude that a perceptible difference exists based on a triangle test

<i>n</i>	$\alpha$					<i>n</i>	$\alpha$				
	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001		0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
6	4	5	5	6	—	27	12	13	14	16	18
7	4	5	5	6	7	28	12	14	15	16	18
8	5	5	6	7	8	29	13	14	15	17	19
9	5	6	6	7	8	30	13	14	15	17	19
10	6	6	7	8	9						
						31	14	15	16	18	20
11	6	7	7	8	10	32	14	15	16	18	20
12	6	7	8	9	10	33	14	15	17	18	21
13	7	8	8	9	11	34	15	16	17	19	21
14	7	8	9	10	11	35	15	16	17	19	22
15	8	8	9	10	12						
						36	15	17	18	20	22
16	8	9	9	11	12	42	18	19	20	22	25
17	8	9	10	11	13	48	20	21	22	25	27
18	9	10	10	12	13	54	22	23	25	27	30

D